

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許条約に基づいて公開された発明の出願

(51) 国際特許分類 C07K 16/18, C12N 5/20, C12P 21/08, C12N 15/06, 15/09, A61K 39/395, 45/00, A01K 67/027	A1	(11) 国際公開番号 WO99/33878 (43) 国際公開日 1999年7月8日(08.07.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05697 (22) 国際出願日 1998年12月16日(16.12.98) (30) 優先権データ 特願平9/367699 1997年12月25日(25.12.97) JP 特願平10/356183 1998年12月15日(15.12.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 玉谷卓也(TAMATANI, Takuya)(JP/JP) 手塚克成(TEZUKA, Katsunari)(JP/JP) 坂本信二(SAKAMOTO, Shinji)(JP/JP) 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内 Kanagawa, (JP) 滝川正春(TAKIGAWA, Masaharu)(JP/JP) 〒703-8281 岡山県岡山市東山二丁目17-22-304 Okayama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシ ア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR AND MEDICINAL USES THEREOF (54) 発明の名称 結合組織増殖因子に対するモノクローナル抗体及びその医薬用途 (57) Abstract A human monoclonal antibody useful for remedying various diseases caused by human connective tissue growth factor (CTGF) and preventing the onset of the above diseases; medicinal uses thereof; and various monoclonal antibodies having various characteristics against various mammalian CTGFs useful for detecting and assaying CTGFs present in the body fluids of mammals suffering from the various diseases.		

(57)要約

ヒト結合組織増殖因子 (CTGF) に起因する種々の疾患の治療及び該疾患の発症の予防に有用なヒトモノクローナル抗体並びにその医薬用途を提供する。さらには、該疾患に罹患している哺乳動物の体液中のCTGFの検出及び定量において有用な種々の哺乳動物のCTGFに対する種々の特性を有する種々のモノクローナル抗体を提供するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN キニア
GW キニア・ビサオ
GR キリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア

LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン

SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明細書

結合組織増殖因子に対するモノクローナル抗体及びその医薬用途

技術分野

本発明は、哺乳動物の結合組織増殖因子 (Connective Tissue Growth Factor、CTGF) に反応性を有するモノクローナル抗体若しくはその一部、該モノクローナル抗体を産生する細胞、該モノクローナル抗体若しくはその一部を固定化してなる抗体固定化不溶性担体、該モノクローナル抗体を標識物質で標識してなる標識抗体、哺乳動物のCTGFの検出、定量、分離または精製に用いられるキット、哺乳動物のCTGFを検出、定量、分離または精製する方法、該モノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物、ヒトCTGF遺伝子導入トランスジェニックマウス、ラットのCTGFポリペプチド、ラットのCTGFをコードするDNA、及びラットのCTGFに反応性を有する抗体に関する。

背景技術

組織傷害における組織の再生は、傷害部位に移入したマクロファージ等の食食細胞等による不用の組織片や細胞片あるいは細菌等の除去、血管系の復元、並びにそれに続く新しい組織との置換を経て行われる。この組織の再生、修復の過程においては、該再生・修復の過程で出現するマクロファージや好中球が産生するトランスフォーミング増殖因子 β (Transforming Growth Factor β (TGF- β)) が最初の調節因子として働くことが明らかとなっている。

TGF- β の機能は多彩であり、間葉細胞の増殖誘導、血管内皮細胞及び上皮細胞の増殖抑制だけでなく、結合組織細胞からの細胞外マトリックス (Extracellular Matrix (ECM)) の産生を調節する機能を有することが知られている。

前記 TGF- β で刺激し増殖誘導が見られる間葉細胞の培養上清においては、血小板由来増殖因子 (Platelet-derived Growth Factor (PDGF)) や結合組織成長因子 (Connective Tissue Growth Factor (CTGF); Hcs 24 と呼ぶ) の産生の増加が観察されることから、TGF- β による細胞増殖誘導活性は、それらの他の制御因子により間接的に発揮されるものであると考えられている。

CTGF については、ヒト及びマウスの CTGF が既に同定されており (なお、ラットの CTGF の同定については、未だ何ら報告されていない。)、それらの物理化学的及び生物学的性状の解析が進められてきている ([ヒト CTGF] J. Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1285-1294, 1991; Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol.29, No.1, p.153-161, 1997; Circulation, Vol.95, No.4, p.831-839, 1997; Cell Growth Differ., Vol.7, No.4, p.469-480, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.106, No.4, p.729-733, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.2, p.280-284, 1995; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.1, p.128-132, 1995; 及び国際特許出願公開 W096/38172 号公報。[マウス CTGF (Fisp12)] 特開平 5-255397 号公報、Cell Growth Differ., Vol.2, No.5, p.225-233, 1991; FEBS Letters, Vol.327, No.2, p.125-130, 1993; 及び DNA Cell Biol., Vol.10, No.4, p.293-300, 1991)。

CTGF は、分子量約 38 kD を有するシステイン残基に富んだ分泌型糖タンパクであり、その生合成及び分泌は TGF- β より誘導されることが明らかにされている。CTGF は、TGF- β による産生誘導を受ける点、PDGF 受容体に結合する点、間葉細胞系の増殖を誘導する点、線維芽細胞や上皮細胞から産生されるという点等で PDGF と類似の性質を有するが、アミノ酸配列相同性はほとんど有さない全く異なる分子である (The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991 及び Molecular Biology of the Cell, Vol.4, p.637-645, 1993)。

また、最近の研究により、ヒト及びマウス繊維芽細胞の培養上清中、並びにブ

タの子宮由来分泌液中には、38 kDaのCTGFの分解物と考えられる生物学的に活性な分子量約10乃至12 kDaの低分子量CTGFが同定されている (Growth Factors, Vol.15, No.3, p.199-213, 1998; J. Biol. Chem., Vol.272, No.32, p.20275-20282, 1997)。

CTGFの生理学的機能及び疾患との関連性についての詳細は未だ完全に明らかにされてはいないものの、CTGFのTGF β による産生誘導、種々の疾患患者の組織及び細胞におけるCTGFのmRNAの有意な発現 (Int. J. Biochem. Cell. Biol., Vol.29, No.1, p.153-161, 1997; Circulation, Vol.95, No.4, p.831-839, 1997; J. Invest. Dermatol., Vol.106, No.4, p.729-733, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.2, p.128-132, 1995; J. Cell Physiol., Vol.165, No.3, p.556-565, 1995 及び Kidney Int., Vol.48, No.2, p.5001-5009, 1995 など)、並びにCTGFの血管内皮細胞の遊走及び増殖の促進に関する知見 (J. Cell. Biol., Vol.114, No.6, p.1285-1294, 1991; Exp. Cell Res., Vol.233, p.63-77, 1997; 歯科基礎医学会誌、第38巻、増刊、第463頁、PD0187、1996 及び第69回日本生化学会要旨、第683頁、1P0535、1996 など) 等から、CTGFが種々疾患の発症及び／または進行に関与する可能性が示唆され初めてきている。

具体的疾患の特定については、今後の研究展開及び研究結果を待たなければならないが、CTGFは、例えば、癌、動脈硬化症、皮膚疾患 (例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイド)、腎疾患、関節炎 (例えば、慢性関節リウマチ)、各種線維症 (動脈硬化、肝硬変、関節炎、強皮症、ケロイド、腎線維化、及び肺線維症等で見られる組織線維化) 等の幅広い範囲の疾患の発症及び／または進行に関与するのではないかと推測される。

このような各種疾患とCTGFとの係わりの解明においては、種々の疾患に罹患している患者及び疾患哺乳動物の体液 (血清など) 中に含まれるCTGF及び／またはその断片を検出及び定量し、その値を、正常な生体 (健常人、正常マウス、正常ラット、及び正常ウサギ等の哺乳動物) における測定値と比較すること

が、有効な一般的な手段である。

CTGFのような分泌性タンパクの検出あるいは定量には、検出しようとする分泌性タンパクに対する抗体（特には、モノクローナル抗体）を用いた抗原抗体反応に基づく免疫学的測定方法、具体的には、ラジオイムノアッセイ（RIA）あるいはエンザイムイムノアッセイ（EIA、ELISA）等のイムノアッセイが、最も簡便で有用な方法として汎用されている。

同様に、CTGFの検出及び定量においても、このようなイムノアッセイによる検出方法及び定量方法、該定量方法の確立に必要とされるCTGFに対するモノクローナル抗体の作製、開発が必要となる。しかしながら、CTGFに対する抗体については、抗血清の作製についての報告はあるものの（Exp. Cell Res., Vol.233, p.63-77, 1997 ; Cell Growth Differ., Vol.8, No.1, p.61-68, 1997 ; 及び第69回日本生化学会要旨、第683頁、1P0534、1996）、モノクローナル抗体、とりわけCTGFに対する高い親和性及び／またはCTGFの活性を中和する能力を有する機能的なモノクローナル抗体については未だ報告されておらず、イムノアッセイによるCTGFの定量系も全く提供されていない。

また、前記のようなCTGFの活性を中和する能力を有するモノクローナル抗体は、そのようなイムノアッセイにおける構成要素としてだけでなく、前述のようなCTGFの分泌に起因する各種疾患の治療及び／または予防における抗体医薬品として有用であるが、該抗体医薬品として使用可能なモノクローナル抗体についても、全く報告されていない。

発明の開示

従って、前記のような種々疾患の発症及び／または進行に関連する可能性を有するCTGFの生物学的機能及び該CTGFと各種疾患との因果関係の解明、並びにCTGFに起因する疾患の治療及び予防における医薬品の有効成分として使用可能な、ヒト、マウス、ラット及びウサギ等の各種哺乳動物のCTGFに反応

性を有するモノクローナル抗体の開発が望まれている。特に、CTGFの機能及びCTGFと各種疾患との関係の解明において必要な手段であるCTGFのイムノアッセイにおいて用いられるモノクローナル抗体としては、該CTGFに対する所望の親和性、CTGFの生物学的活性を中和する能力、及び／または種々の哺乳動物に対する所望の交叉反応性 (cross reactivity) を有するモノクローナル抗体の開発が求められている。

さらに、該種々疾患に罹患している患者の治療及び／または予防に用いられるモノクローナル抗体としては、該中和活性に加え、該患者に対する抗原性を低減または消失させたモノクローナル抗体の開発が求められている。

本発明者らは、上述のような社会的ニーズを満たすために、各種哺乳動物のCTGFに対するモノクローナル抗体に関して鋭意研究した結果、種々の哺乳動物に由来するCTGFを免疫原として用いることにより、抗原特異性、抗原親和性、中和活性、及び交叉反応性等の性質の点で、各々異なる特性を有する種々の哺乳動物のCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を作製することに成功した。

また、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスをヒトのCTGFで免疫することによって、ヒトCTGFに対する種々のヒトモノクローナル抗体を作製することに世界に先んじて初めて成功した。

さらに、前者の種々のモノクローナル抗体を用いて構築した種々のイムノアッセイ系により、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギ等）の体液（血清等）中のCTGFを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で定量できることを見出し本発明を完成するに到った。

また、後者のヒト抗体が、ヒトCTGFの活性を有意に中和するのみならず、例えば、組織繊維症（例えば、腎繊維症など）の治療効果を有することを見出し、本願発明を完成するに到った。これらのヒト抗体は、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点（副作用）で

あったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、抗体の医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

即ち、本発明は、患者の治療及び予防における医薬品として、またヒト、マウス及びラット等の各種哺乳動物の体液中に含まれるCTGFを検出及び定量するためのイムノアッセイにおける構成要素として有用な種々の特性を有する各種哺乳動物に対するモノクローナル抗体を、本発明の分野において初めて提供するものである。

さらに、本発明は、そのようなCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を用いることによるCTGFのイムノアッセイ方法及びアッセイキットを初めて提供するものである。

本発明のヒトCTGFに対するモノクローナル抗体は、ヒトに対する抗原性を惹起することなく、CTGFに起因する種々の疾患の治療及び予防するための医薬品として極めて有用である。

また、本発明のモノクローナル抗体を用いたイムノアッセイにより、ヒトは勿論、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギなど）の正常な生体並びに疾患に罹患している生体の体液中に存在するCTGFを、インタクト（intact）な状態で簡便かつ高感度で検出及び定量できる。

即ち、本発明の下記のとおりのものである。

（１） 下記の（a）乃至（g）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部：

（a）ヒト、マウス及びラットの結合組織増殖因子（CTGF）のいずれにも反応性を有する；

（b）ヒト及びマウスのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つラットのCTGFに反応性を有しない；

（c）マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しない；

(d) ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とヒトの C T G F との結合、または該細胞株 293-T とマウスの C T G F との結合を阻害する；

(e) ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトの C T G F との結合を阻害する；

(f) ヒトの C T G F またはマウスの C T G F の刺激によるラット腎臓由来線維芽 NRK-49F (ATCC CRL-1570) の細胞増殖を阻害する；または

(g) ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

(2) モノクローナル抗体が、下記の (a) 乃至 (c) のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする前記 (1) に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒトの C T G F またはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットの C T G F のいずれにも反応性を有する；

(b) マウスの C T G F またはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットの C T G F のいずれにも反応性を有する；または

(c) マウスの C T G F またはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットの C T G F のいずれにも反応性を有する。

(3) モノクローナル抗体が、下記の (a) 乃至 (c) のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする前記 (1) に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒトの C T G F またはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットの C T G F のいずれにも反応性

を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とヒトの C T G F との結合を阻害する；

(b) マウスの C T G F またはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットの C T G F のいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とマウスの C T G F との結合を阻害する；または

(c) マウスの C T G F またはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットの C T G F のいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とマウスの C T G F との結合を阻害する

(4) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記 (1) に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(5) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記 (1) に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(6) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記 (1) に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(7) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記 (1) に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(8) ヒト、マウス、またはラットの C T G F のいずれかに反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(9) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(8)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(10) 下記の(a)乃至(d)のいずれかに記載の性質を有するヒトのCTGFに反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(b) ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(c) ヒトのCTGFまたはマウスのCTGFの刺激によるラット腎臓由来線維芽 NRK-49F (ATCC CRL-1570) の細胞増殖を阻害する；または

(d) ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

(11) ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(8)乃至前記(10)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(12) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFを、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(11)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(13) トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする前記(8)乃至前記(12)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(14) 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするV領域のD

NAが、DP-5、DP-38、DP-65 及び DP-75 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする前記（８）乃至前記（１３）のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

（１５） 該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DPK1、DPK9、DPK12 及び DPK24 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする前記（８）乃至前記（１３）のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

（１６） 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DP-5、DP-38、DP-65 及び DP-75 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来し、且つ該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DPK1、DPK9、DPK12 及び DPK24 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする前記（８）乃至前記（１５）のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

（１７） 該ヒトモノクローナルの重鎖可変領域が、下記（a）乃至（j）のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする前記（９）に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部：

（a）配列番号 6 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列；

（b）配列番号 6 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

（c）配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 118 番目のアミノ酸配列；

（d）配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 118 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

(18) 該ヒトモノクローナルの軽鎖可変領域が、下記 (a) 乃至 (j) のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする前記 (9) に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 1

21番目のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号20に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号23乃至117番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号20に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号23乃至117番目のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号22に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号17乃至111番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号22に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号17乃至111番目のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号24に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号23乃至118番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号24に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号23乃至118番目のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

(19) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6535で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(20) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6535で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(21) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6598で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(22) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6598で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(23) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6599で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(24) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6599で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(25) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(26) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(27) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部であって、該モノクローナル抗体が、該モノクローナル抗体をヒトのCTGFに反応性を有する前記(17)若しくは前記(18)に記載のいずれかのモノクローナル抗体とヒトのCTGFからなる抗原抗体複合体に反応させた時、該抗原抗体複合体に反応性を有しないことを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部。

(28) 該モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(27)に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(29) ラットのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(30) 可変領域が前記(2)乃至前記(7)、前記(27)または前記(2

9) のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の可変領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトの C T G F に反応性を有する組換えキメラモノクローナル抗体。

(31) 超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が前記(2)乃至前記(7)、前記(27)または前記(29)のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の相補性決定領域であり、超可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の枠組領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトの C T G F に反応性を有する組換えヒト型モノクローナル抗体。

(32) 前記(1)乃至前記(29)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する細胞。

(33) 前記(30)または前記(31)に記載の組換えモノクローナル抗体を産生する細胞。

(34) 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を哺乳動物由来の B 細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記(32)に記載の細胞。

(35) 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードする DNA 若しくはその軽鎖をコードする DNA のいずれか一方の DNA、または両方の DNA が細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記(32)または前記(33)に記載の細胞。

(36) 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(37) 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(38) 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6599 で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(39) 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6600 で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(40) 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(41) 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(42) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体が固定化されていることを特徴とする抗体固定化不溶性担体。

(43) 不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする前記(42)に記載の抗体固定化不溶性担体。

(44) 不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはアフィニティークラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする前記(42)に記載の抗体固定化不溶性担体。

(45) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識抗体。

(46) 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする前記(45)に記載の標識抗体。

(47) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体、前記(42)若しくは前記(43)に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記(45)若しくは前記(46)に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか1つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体または標識抗体を含んでなることを特徴とする哺乳動物のCTGFの検出または定量に用いられるキット。

(48) 前記(42)若しくは前記(43)に記載の抗体固定化不溶性担体、

及び前記（４５）若しくは前記（４６）に記載の標識抗体を含んでなることを特徴とする前記（４７）に記載の哺乳動物のＣＴＧＦの検出または定量に用いられるキット。

（４９） 前記（１）乃至前記（３１）のいずれかに記載のモノクローナル抗体、前記（４２）若しくは前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記（４５）若しくは前記（４６）に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか１つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体、または標識抗体を用いることを特徴とするイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する方法。

（５０） 少なくとも下記（ａ）及び（ｂ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４２）または前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

（ｂ）該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のＣＴＧＦとの結合により形成される抗原抗体複合体に、前記（４５）または前記（４６）に記載の標識抗体を反応せしめる工程。

（５１） 少なくとも下記（ａ）及び（ｂ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４５）または前記（４６）に記載の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

（ｂ）該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物のＣＴＧＦとの結合により形成される抗原抗体複合体に、前記（４２）または前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

（５２） 少なくとも下記（ａ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４２）若しくは前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体、

前記（４５）若しくは前記（４６）に記載の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

（５３） 少なくとも下記（ａ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４２）または前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質を反応せしめる工程。

（５４） 少なくとも下記（ａ）及び（ｂ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質との混合物に、前記（１）乃至前記（３１）のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

（ｂ）該試料中に含まれる哺乳動物のＣＴＧＦ若しくは該標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

（５５） 少なくとも下記（ａ）乃至（ｃ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）試料に、前記（１）乃至前記（３１）のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

（ｂ）（ａ）の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質を反応せしめる工程；及び

（ｃ）該試料中に含まれる哺乳動物のＣＴＧＦ若しくは該標識された哺乳

動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

(56) 前記(42)または前記(44)に記載の抗体固定化不溶性担体を含んでなる哺乳動物のCTGFの分離または精製に用いられるキット。

(57) 前記(42)または前記(44)に記載の抗体固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする哺乳動物のCTGFを分離または精製する方法。

(58) アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである前記(57)に記載の哺乳動物のCTGFの精製方法。

(59) ヒトのCTGFをコードするDNAが、内在性遺伝子座に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

(60) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するラットのCTGF。

(61) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するラットのCTGFをコードするDNA。

(62) DNAが、配列番号1に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むことを特徴とする前記(61)に記載のDNA。

(63) 前記(2)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

(64) 前記(9)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物。

(65) 前記(14)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部を含んでなる医薬組成物。

(66) 該医薬組成物が、CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞

の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする前記（６３）乃至前記（６５）のいずれかに記載の医薬組成物。

（６７） 該医薬組成物が、ＣＴＧＦの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を伴う疾患を治療または予防するための前記（６３）乃至前記（６５）のいずれかに記載の医薬組成物。

（６８） 該細胞の増殖が、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髓、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管からなる群から選ばれる組織における細胞の増殖であることを特徴とする前記（６６）または前記（６７）に記載の医薬組成物。

（６９） 該組織が、肺、肝臓、腎臓、または皮膚であることを特徴とする前記（６８）に記載の医薬組成物。

（７０） 該組織が、腎臓であることを特徴とする前記（６９）に記載の医薬組成物。

（７１） 該疾患が、さらに組織の繊維化を伴う疾患であることを特徴とする前記（６７）に記載の医薬組成物。

（７２） 該組織の繊維化が、肺、肝臓、腎臓または皮膚における繊維化であることを特徴とする前記（７１）に記載の医薬組成物。

（７３） 該組織の繊維化が、腎臓における繊維化であることを特徴とする前記（７２）に記載の医薬組成物。

（７４） ＣＴＧＦ阻害剤またはＣＴＧＦ産生阻害剤、並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における疾患を治療または予防するための医薬組成物。

（７５） 該阻害剤が、ＣＴＧＦに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記（７４）に記載の医薬組成物。

（７６） 該阻害剤が、前記（９）乃至前記（３１）のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記（７４）に記載の医薬組成物。

(77) 該阻害剤が、前記(14)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(76)に記載の医薬組成物。

(78) 該疾患が、組織の繊維化に伴う疾患であることを特徴とする前記(74)乃至前記(77)のいずれかに記載の医薬組成物。

(79) CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞のCTGFの刺激による増殖を抑制する能力を有する物質、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における該細胞の増殖を抑制するための医薬組成物。

(80) 該物質が、CTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(79)に記載の医薬組成物。

(81) 該阻害剤が、前記(9)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(79)に記載の医薬組成物。

(82) 該阻害剤が、前記(14)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(81)に記載の医薬組成物。

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウサギ、ラット、ハムスターまたはマウスであり、特に好ましくは、ヒト、ラット、ハムスターまたはマウスである。

本発明で用いられる「ヒト以外の哺乳動物」及び「非ヒト哺乳動物」なる用語は各々同義であり、前述に定義した哺乳動物におけるヒト以外のあらゆる哺乳動物を意味する。

本発明において用いられる「アミノ酸」とは、自然界に存在するあらゆるアミノ酸を意味し、好ましくは、アミノ酸を表記するために用いられるアルファベッ

トの三文字表記法または一文字表記法に従って各々下記のように表されるアミノ酸を意味する。

グリシン (Gly/G)、アラニン (Ala/A)、バリン (Val/V)、ロイシン (Leu/L)、イソロイシン (Ile/I)、セリン (Ser/S)、スレオニン (Thr/T)、アスパラギン酸 (Asp/D)、グルタミン酸 (Glu/E)、アスパラギン (Asn/N)、グルタミン (Glu/Q)、リジン (Lys/K)、アルギニン (Arg/R)、システイン (Cys/C)、メチオニン (Met/M)、フェニルアラニン (Phe/F)、チロシン (Tyr/Y)、トリプトファン (Trp/W)、ヒスチジン (His/H)、プロリン (Pro/P)。

本発明でいう「結合組織増殖因子 (Connective Tissue Growth Factor (CTGF))」とは、前記哺乳動物の C T G F であり、例えば、前述に記載したとおりの既報に報告される構造及び機能を有するヒト及びマウスの C T G F を包含する(例えば、The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991、Molecular Biology of the Cell, Vol.4, p.637-645, 1993、及び Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol.234, p.206-210, 1997 など)。また、本願発明の 1 つであるラットの C T G F も包含することは言うまでもない。

また、本発明で言う結合組織増殖因子には、当該文献に記載された分子量約 38kDa の C T G F (例えば、ヒト C T G F) はもちろんのこと、当該分子量約 38kDa の全長 C T G F (例えば、ヒト C T G F) の分解物と考えられる分子量約 10 乃至 12kDa の低分子量 CTGF 蛋白をも包含する (Growth Factors, Vol.15, No.3, p.199-213, 1998 ; J. Biol. Chem., Vol.272, No.32, p.20275-20282, 1997)。この低分子量 CTGF の構造は未だ明らかにされていないものの、ヒト C T G F にあっては、349 アミノ酸からなる全長ヒト C T G F の 246 番目のロイシン (Leu246) と 247 番目のグルタミン酸 (Glu247) の間で切断されることにより生ずると考えられる 103 個のアミノ酸からなる C 末端蛋白 (分子量：約 11,800Da)、あるいは、同全長ヒト C T G F の 247 番目のグルタミン酸 (Glu247) と 248 番目のグルタミン酸 (Glu248) との間で切断されることにより生ずると考えられる 102 個のアミ

ノ酸からなるC末端蛋白（分子量：約11,671Da）である可能性を有する。

さらに、後述する本願発明に係る「モノクローナル抗体」が天然型のタンパク一次構造（アミノ酸配列）を有するCTGF（特には、ヒトCTGF）またはその一部に反応性を有する限り、本発明でいう該CTGFには、該天然型のタンパクまたはその一部のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するCTGFも包含する。

本発明において使用される、「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」なる用語は、天然型のCTGFと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有するタンパク、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するタンパクをも包含することを意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数の組み合わせの場合であってもよい。

本発明におけるCTGFは、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

また、本発明におけるCTGFには、該CTGFの「一部」も包含される。ここで「CTGFの一部」とは、前記に定義したCTGF（前述の分子量約10乃至12kDaの低分子量CTGFを含む）のアミノ酸配列中の任意の部分配列を含むポリペプチドを意味し、具体的には5乃至100アミノ酸残基を有するCTGFペプチドフラグメント（例えば、C末端側）、より具体的には5乃至50アミノ酸残基を有するCTGFペプチドフラグメント、さらに具体的には5乃至30アミノ酸残基を有するペプチドフラグメントが包含される。好ましくは、CTGFがその受容体と結合若しくは相互作用する部位（受容体結合部位など）またはCTGFがその生物学的機能を発揮するために必要な部位（活性部位など）を含むCT

G Fの部分構造である。

これらのポリペプチド（部分構造、フラグメント）は、後述する当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離したC T G Fをタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。

本発明における「モノクローナル抗体」とは、哺乳動物の結合組織増殖因子（C T G F）またはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体である。具体的には、前記発明（1）乃至前記発明（31）のいずれかに記載される特徴を有するモノクローナル抗体である。さらに具体的には、後述の実施例並びに図面に記載されるような様々な特性及び産業上の有用性を有する各種のモノクローナル抗体である。

本発明のモノクローナル抗体における好ましい態様としては、例えば、下記①乃至④のモノクローナル抗体が挙げられる。

① 前記（1）に記載のモノクローナル抗体における（d）乃至（g）のいずれかの性質を有するモノクローナル抗体。

② 前記（2）に記載のモノクローナル抗体。

③ 前記（4）乃至前記（7）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

④ 前記（9）乃至前記（31）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記①乃至④に記載のモノクローナル抗体に包含されるヒトモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のC T G Fの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記①乃至④に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得る。

本願発明のモノクローナル抗体のさらに好ましい態様としては、例えば、下記

⑤または⑥のモノクローナル抗体が挙げられる。

⑤ 前記（１）に記載のモノクローナル抗体における（d）乃至（g）のいずれかの性質を有するモノクローナル抗体。

⑥ 前記（４）乃至前記（７）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

ト） 前記（１０）、前記（１４）乃至前記（２８）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記⑤乃至⑥に記載のモノクローナル抗体に包含されるヒトモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のＣＴＧＦの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記⑤乃至⑥に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得る。

本願発明のモノクローナル抗体の特に好ましい態様としては、例えば、下記⑦または⑧のモノクローナル抗体を挙げることができる。

⑦ 前記④乃至⑦に記載のモノクローナル抗体。

⑧ 前記（１４）乃至（２６）または前記（２８）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記⑧に記載のモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のＣＴＧＦの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記⑦乃至⑧に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得る。

本願発明のモノクローナル抗体のとりわけ好ましい態様としては、例えば、下記⑨乃至⑭のモノクローナル抗体を挙げることができる。

⑨ 前記（４）または（６）に記載のモノクローナル抗体。

⑩ 前記（１４）乃至前記（１６）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

⑪ 前記(17)に記載のモノクローナル抗体における(a)、(c)、(e)、(g)または(i)に記載の特徴を有するモノクローナル抗体。

⑫ 前記(18)に記載のモノクローナル抗体における(a)、(c)、(e)、(g)または(i)に記載の特徴を有するモノクローナル抗体。

⑬ 前記(19)、前記(21)、前記(23)または前記(25)のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

⑭ 前記(28)に記載のモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記⑩乃至⑭のいずれかに記載のモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のCTGFの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記⑨乃至⑭に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得るが、特に上記⑨に記載のモノクローナル抗体が好ましい。

本発明の「モノクローナル抗体」は、前記に定義した結合組織増殖因子(天然体、組換え体、合成物、細胞培養上清を含む)若しくはその一部を抗原(免疫源)として用い、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体(CDR-grafted抗体)、並びに例えば、ヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒトモノクローナル抗体も包含する。

さらには、後述する本発明の「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」から産生されるような、遺伝子組換えモノクローナル抗体も本発明のモノクローナル抗体に包含される。

またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA(IgA1、IgA2)、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、好ましくはIgG2

またはIgG4) またはIgMであり、さらに好ましくはIgGである。

本発明で言うポリクローナル抗体(抗血清)あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント(Freund's Adjuvant)とともに、哺乳動物(後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む)、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞(ミエローマ細胞)から融合細胞(ハイブリドーマ)を調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

また、後述する本発明の「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」によっても製造できる。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述の結合組織増殖因子(CTGF;天然体、組換え体、合成物、細胞培養上清を含む)若しくはその一部を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント(Freund's Adjuvant)とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター(後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む)の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日

後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

モノクローナル抗体を分泌する融合細胞（ハイブリドーマ）の調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-AG8.653 (ATCC No. CRL1580)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2)、PAI、FO あるいは BW5147、ラット由来ミエローマ 210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマ U-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11 あるいは CEM-T15 を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生する細胞（例えば、ハイブリドーマ）のスクリーニングは、該細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

また、該ハイブリドーマあるいは後述する本発明の「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日経サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

該細胞をインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham's F12 培地、MCDB153 培地あるいは低カルシウム MEM 培地等の低カルシウム培地及び MCDB104 培地、MEM 培地、D-MEM 培地、RPMI1640 培地、ASF104 培地あるいは R D 培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

本発明のモノクローナル抗体には、該抗体を構成する重鎖及び／または軽鎖の各々のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／または軽鎖からなるモノクローナル抗体も包含されるが、ここで、「数個のアミノ酸」とは、複数個のアミノ酸を意味し、

具体的には1乃至10個のアミノ酸であり、好ましくは1乃至5個のアミノ酸である。

本発明のモノクローナル抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（Site specific mutagenesis）を用いて常法により導入することができる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.81, p.5662-5666, 1984）。

本発明における「ヒトモノクローナル抗体」とは、前記に定義したような哺乳動物のCTGF（好ましくはヒトのCTGF）に反応性を有するヒトモノクローナル抗体である。例えば、後述の実施例及び図面に記載されるような様々な特性を有する各種のヒトモノクローナル抗体を挙げることができる。

具体的には、イムノグロブリンを構成する重鎖（H鎖）の可変領域（Variable region）及びH鎖の定常領域（Constant Region）並びに軽鎖（L鎖）の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するヒトイムノグロブリンである。L鎖としては、ヒトκ鎖またはヒトλ鎖が挙げられる。

本発明のヒトモノクローナル抗体は、例えば、既報の方法に従って製造することができる「ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウス」に代表されるような「ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物」を、前記に定義した哺乳動物のCTGFで免疫することによって製造することができる。当該非ヒト哺乳動物への免疫及び抗体産生融合細胞（ハイブリドーマ）の製造及びスクリーニング、並びに当該ヒトモノクローナル抗体の大量調製は、前述の一般的な方法を用いて実施することができる（Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994；Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997；特表平4-504365号公報；特表平7-509137号公報；日経サイエンス、6月号、第40～

第50頁、1995年；国際出願公開WO 94/25585号公報；Nature, Vol.368, p.856-859, 1994；及び特表平6-500233号公報など）。

該ヒト抗体産生トランスジェニックマウスは、具体的には、例えば下記の工程からなる手法を用いることにより作製できる。他のヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物も同様にして製造することができる。

(1) マウス内在性イムノグロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で置換することにより該マウス内在性イムノグロブリン重鎖遺伝子が機能的に不活性化されたノックアウトマウスを作製する工程。

(2) マウス内在性イムノグロブリン軽鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で置換することにより該マウス内在性イムノグロブリン軽鎖遺伝子（特に κ 鎖遺伝子）が機能的に不活性化されたノックアウトマウスを作製する工程。

(3) 酵母人工染色体（Yeast artificial chromosome, YAC）ベクター等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

(4) YAC 等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン軽鎖（特に κ 鎖）遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

(5) 前記(1)乃至(4)のノックアウトマウス及びトランスジェニックマウスを任意の順序で交配することにより、マウス内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座及びマウス内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座がともに機能的に不活性化され、且つヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域及ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の所望の領域がともにマウス染色体上に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

前記ノックアウトマウスは、マウス内在性イムノグロブリン遺伝子座の適当な領域を外来性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で相同組換えにより置換することにより該遺伝子座が再構成（リアレンジメント）できないように不活性化することにより作製できる。該相同組換えを用いた不活性化には、例えば、ポジティブ・ネガティブ・セレクション（Positive Negative Selection; PNS）と呼称される方法を用いることができる（日経サイエンス，5月号，p.52-62，1994）。

イムノグロブリン重鎖遺伝子座の機能的な不活性化には、例えば、J領域またはC領域（例えばC μ 領域）の一部に障害を導入することにより達成できる。またイムノグロブリン軽鎖（例えば κ 鎖）に機能的な不活性化は、例えば、J領域若しくはC領域の一部、またはJ領域及びC領域にまたがる領域を含む領域に障害を導入することにより達成可能である。

トランスジェニックマウスは、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）に由来するHPRT陰性（ヒポキサンチン・グアニン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている）ES細胞（embryonic stem cell）を、該ヒトイムノグロブリン重鎖遺伝子座または軽鎖遺伝子座をコードする遺伝子またはその一部並びにHPRT遺伝子が挿入されたYACベクターを含む酵母とスフェロプラスト融合法により融合する。該外来性遺伝子がマウス内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞をHATセレクション法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980；米国特許第4,873,191号公報）。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれる。該キ

メラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ (heterogeneous) トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ (homogeneous) トランスジェニックマウスが得られる。

本発明における「キメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスターなど)のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス/ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウス/ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学(臨時増刊号)、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV_H遺伝子(H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子)の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したC_H遺伝子(H鎖定常領域をコードするC遺伝子)を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV_L遺伝子(L鎖可

変領域をコードする再配列されたV J 遺伝子)の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC_L 遺伝子 (L鎖定常領域をコードするC遺伝子)を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素(例えばEcoRI、HindIII等)を用いて消化し、電気泳動に付して(例えば0.7%アガロースゲル使用)サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25M HCl 溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH 溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイクン(75℃、3時間)を行う。ベイクン終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS 溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS 溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

次に、この中に³²P 標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間(例えば、2×SSC-0.1%SDS 溶液、室温、1時間)のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ 遺伝子及びVJ 遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター(例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL 3、λEMBL 4等)に組み込み、該

ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539 等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（ κ ）J遺伝子等）を用いて、例えばペントンディビス法（サイエンス（Science）、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブラークハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列された V_H (VDJ)遺伝子あるいは V_L (VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒト C_H 遺伝子及びヒト C_L 遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、 C_H 遺伝子である C_{γ_1} 遺伝子と C_L 遺伝子である C_{κ} 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒト C_{γ_1} 遺伝子及びヒト C_{κ} 遺伝子に相当するマウス C_{γ_1} 遺伝子及びマウス C_{κ} 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には、例えば、クローン Ig146（プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第75巻、第4709～第4713頁、1978年）からの3kbのHindIII-BamHI断片とクローン MEP10（プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第78巻、第474～第478頁、1981年）からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダ Charon 4A のHaeIII-AluIゲノムライブラリー（セル(Cell)、第15巻、第1157～第1174頁、1978年）中から、ヒト C_{κ} 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒト C_{γ_1} 遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9Kbのバンドを λ 778に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

このようにして単離されたマウス V_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子、及びヒト C_H 遺伝子とヒト C_L 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウス V_H 遺伝子の下流にヒト C_H 遺伝子を、またマウス V_L 遺伝子の下流にヒト C_L 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えば pSV2gpt あるいは pSV2neo 等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス V_H 遺伝子／ヒト C_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子／ヒト C_L 遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えば P3X63・Ag8・653 細胞あるいは SP210 細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

本発明における「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted 抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue ; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域とは、

該 3 つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された 4 つの領域 (Framework ; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、I g G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、I g M、I g A、I g D 及び I g E 等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒト I g G の定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平 4 - 5 0 6 4 5 8 号公報及び特開昭 6 2 - 2 9 6 8 9 0 号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも 1 つのマウス H 鎖 C D R 遺伝子と該マウス H 鎖 C D R 遺伝子に対応する少なくとも 1 つのマウス L 鎖 C D R 遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウス H 鎖 C D R に対応するヒト H 鎖 C D R 以外の全領域をコードするヒト H 鎖遺伝子と、前マウス L 鎖 C D R に対応するヒト L 鎖 C D R 以外の全領域をコードするヒト L 鎖遺伝子を単離する。

単離した該マウス H 鎖 C D R 遺伝子と該ヒト H 鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウス L 鎖 C D R 遺伝子と該ヒト L 鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう 1 つの発現ベクターに導入する。または、該マ

ウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

本発明における「モノクローナル抗体」には、該モノクローナル抗体の「一部」も包含される。該「モノクローナル抗体の一部」とは、前述の本発明におけるモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、 sFv 、 $dsFv$ (disulphide stabilised Fv) あるいは dAb (single domain antibody) である (エキスパート・オピニオン・オン・テラビューティック・パテンツ (Exp. Opin. Ther. Patents), 第6巻, 第5号, 第441~456頁, 1996年)。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 Fab' 」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、 IgG をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L鎖可変領域) と C_L (L鎖定常領域) からなるL鎖、及び V_H (H鎖可変領域) と $C_H\gamma 1$ (H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 Fab' という。また IgG をペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの Fab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

本発明の「モノクローナル抗体を産生する細胞」あるいは「組換えモノクロー

ナル抗体を産生する細胞」とは、前述した本発明のモノクローナル抗体を産生する任意の細胞を意味する。具体的には、例えば、下記（１）乃至（３）のいずれかに記載される細胞を挙げることができる。

（１）前記で定義した哺乳動物のＣＴＧＦ（好ましくはヒトのＣＴＧＦ）若しくはその一部または該ＣＴＧＦを分泌する細胞等で、前述のヒト以外の哺乳動物または前述のヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウス（若しくは他のトランスジェニック非ヒト哺乳動物）を免疫することにより得られ、該ＣＴＧＦに反応性を有するモノクローナル抗体を産生する該動物から採取され得るモノクローナル抗体産生Ｂ細胞。

（２）そのようにして得られた抗体産生Ｂ細胞を哺乳動物由来のミエローマ細胞と細胞融合して得られる前述の融合細胞（ハイブリドーマ）。

（３）該モノクローナル抗体産生Ｂ細胞またはモノクローナル抗体産生融合細胞（ハイブリドーマ）から単離される該モノクローナル抗体をコードする遺伝子（重鎖をコードする遺伝子若しくは軽鎖をコードする遺伝子のいずれか一方、または両方の遺伝子）で、該Ｂ細胞及びハイブリドーマ以外の細胞（例えば、CHO（Chinese hamster ovarian）細胞）、BHK（Baby hamster kidney）細胞などを形質転換して得られるモノクローナル抗体産生形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）。

ここで、前記（３）に記載のモノクローナル抗体産生形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）は、即ち、前記（１）のＢ細胞または（２）のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の遺伝子組換え体を産生する遺伝子組換え細胞を意味する。これらの抗体産生形質転換細胞は、前述のキメラモノクローナル抗体及びヒト型モノクローナル抗体の製造において用いられる一般的遺伝子組換え技術を用いて製造することができる。

本発明における「実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体」とは、当該モノクローナル抗体の生物学的性質が、他のモノクローナル抗体の生物学的性質と比較した場合に、少なくとも下記の点で有意な差を有しないことを意味する。

(1) 当該モノクローナル抗体を作製するために、非ヒト哺乳動物の免疫に用いた特定の動物由来のCTGFに対する反応性。

(2) 当該特定の動物種のCTGFに対応する他の動物種のCTGFに対する反応性(所謂、交叉反応性)。

(3) 後述の実施例に記載される種々の試験により求められる特性。

本発明における「哺乳動物由来の抗血清」とは、該本発明のモノクローナル抗体またはその一部に反応性を有する抗体を含む血清を意味する。該抗血清は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ブタあるいはウシ等の哺乳動物、好ましくはラット、モルモット、ウサギあるいはヤギに、前記本発明のモノクローナル抗体あるいはその一部を、前述モノクローナル抗体の製造方法で述べたような方法で免疫して製造することができる。

本発明における「不溶性担体」とは、本発明のモノクローナル抗体若しくはその一部(抗体フラグメント)、または試料(例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)中に含まれるCTGFを物理学的吸着あるいは化学的結合等によって担持させるための支持体を意味する。

例えば、下記(A)並びに(B)などを挙げることができる。

(A) ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ(特には、マイクロビーズ)、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等。

(B) セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

本発明の「抗体固定化不溶性担体」とは、前記のような不溶性担体上に、本発明のモノクローナル抗体(または該抗体の一部、即ち抗体フラグメント)が、物

理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある不溶性担体を意味する。これらの抗体固定化不溶性担体は、試料（例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを検出、定量、分離または精製するために用いることができる。

該検出または定量の目的においては、前記（A）に例示した不溶性担体を用いることができ、とりわけ定量に用いる不溶性担体としては、操作の簡便性及び多数検体の同時処理の観点を考慮すると、例えば96穴マイクロタイタープレートあるいは48穴マイクロタイタープレート等の多数のウェル（Well、穴）を有するプラスチック等で作製されたマルチウェルマイクロタイタープレートを用いるのが好ましい。また、該分離または精製の目的においては、前記（A）に例示したフィルター若しくはメンブレンまたは前記（B）に例示した不溶性担体を用いることができる。

本発明における「単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質」とは、それらを、前述のようなモノクローナル抗体若しくはその一部（抗体フラグメント）、あるいはCTGFの標準物質に物理化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするために用いられる物質を意味する。

具体的には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等であり、さらに具体的には、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビ

オチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。

ここで、放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらすことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらす。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。例えば、ペルオキシダーゼの場合には、基質として過酸化水素を用いる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的であるが、この限りではない。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

本発明における「標識抗体」及び「標識された哺乳動物のCTGFの標準物質」とは、各々前記のような種々標準物質で標識されたモノクローナル抗体（または抗体フラグメント）及びCTGFを意味する。これらの標識抗体及び標識標準物質は、試料（例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを検出、定量、分離または精製するために用いることができる。本発明においては、上記のいずれの標識物質をも使用可能であるが、検出感度あるいは定量感度の高さ及び操作の利便性の点を考慮すると、ペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識するのが好ましい。

ここで「CTGFの標準物質」とは、試料中に含まれる濃度（含量）未知のCTGFと対照的に、あらかじめ単離されているCTGFを意味し、アッセイの目的に応じて自由にその濃度をコントロールすることができる標品（スタンダード）を意味する。該標準物質は、例えば、検量線の作成に用いることができる。

本発明における「イムノアッセイ」とは、抗原抗体反応の原理に基づき、試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原の検出あるいは定量を行う方法を意味し、本発明においては、該抗原抗体反応に

おける抗体が、本発明の哺乳動物のCTGFに反応性を有する前記のようなモノクローナル抗体（若しくはその抗体のフラグメント）、前記のような抗体固定化不溶性担体（若しくは抗体フラグメント固定化不溶性担体）、または前記のような標識抗体（若しくは標識抗体フラグメント）から選ばれる一つ以上の該モノクローナル抗体（または抗体フラグメント）をであること、及び抗原が哺乳動物のCTGFであること以外は、これまでに知られているイムノアッセイをも適用することができる。

具体的には、酵素免疫測定法（第3版、石川榮治ら編集、医学書院発行、1987年）に記載されているような、例えば、一抗体固相法、二抗体液相法、二抗体固相法、サンドイッチ法、EMIT法（Enzyme multiplied immunoassay technique）、エンザイムチャネリングアッセイ（Enzyme channeling immunoassay）、酵素活性修飾物質標識イムノアッセイ（Enzyme modulator mediated enzyme immunoassay、EMMIA）、酵素阻害物質標識イムノアッセイ（Enzyme inhibitor immunoassay）、イムノエンザイムメトリックアッセイ（Immunoenzymometric assay）、酵素活性増強イムノアッセイ（Enzyme enhanced immunoassay）あるいはプロキシマールリンケージイムノアッセイ（Proximal linkage immunoassay）等、さらには、特公平2-39747号公報に記載されているようなワンボット法を挙げることができる。

本発明においては、このようなイムノアッセイを、目的に応じて適宜選択して用いることができるが、操作上の簡便性及び／または経済的な利便性、とりわけ临床上での汎用性の点を考慮すると、サンドイッチ法、ワンボット法、一抗体固相法または二抗体液相法を用いるのが好ましく、より好ましくは、サンドイッチ法またはワンボット法である。特に好ましくは、本発明のモノクローナル抗体を、96穴マイクロプレートに代表されるような多数のウェルを有するマルチウェルマイクロプレートに固定化した抗体固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるサンドイッチ法、あるいは本発明のモノク

ローナル抗体を、マイクロビーズ等のビーズまたは微小なボールに固定化した抗体固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるワンポット法である。

特に好ましい態様において具体的な一例を挙げるならば、図1に記載のモノクローナル抗体である「8-64-6」または「13-51-2」をマイクロプレートまたはマイクロビーズに固定化した抗体固定化不溶性担体と、図1に記載されるモノクローナル抗体である「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるサンドイッチ法またはワンポット法である。

「8-64-6」を固定化した抗体固定化不溶性担体と、「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるイムノアッセイでは、ヒト及びマウスのCTGFを高感度で検出、定量することができる。また、「13-51-2」を固定化した抗体固定化不溶性担体と、「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるイムノアッセイでは、ラット（本願において初めて開示される）及びマウスのCTGFを高感度で検出、定量することができる。

以下に、サンドイッチ法、ワンポット法、一抗体固相法及び二抗体液相法について詳述する。

サンドイッチ法は、前述の本発明の前記（50）で述べた方法、即ち、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイ法である。

（a）本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

（b）該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の標識抗体を反応せしめる工程。

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて、

ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

（工程1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化し、抗体固定化マイクロプレートを作製する工程；

（工程2）該抗体固定化マイクロプレートにヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該マイクロプレート上に固定化されているモノクローナル抗体と試料とを反応させる工程；

（工程3）該マイクロプレートを洗浄し未反応の試料を該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程4）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程5）工程3で洗浄されたマイクロプレートに、該標識抗体を加え、該マイクロプレート上に固定化されたモノクローナル抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスのCTGFとが反応して形成される抗原抗体複合体に該標識抗体を反応させる工程；

（工程6）マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識抗体を、該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程7）工程6で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程5でペルオキシダーゼ

等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合) またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン (但し、工程 5 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合) を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程 ;

(工程 8) 工程 7 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程 ;

(工程 9) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程 ; 及び

(工程 10) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

ワンボット法は、前述の本発明の (50)、(51) または (52) で各々述べた方法である。

即ち、第 1 は、少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程 ; 及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物の CTGF との結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の標識抗体を反応せしめる工程。

第 2 は、少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の標識抗体と、試料を反応せしめる工程 ; 及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物の CTGF との結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

第 3 は、少なくとも下記 (a) の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体、本発明の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化した「抗体固定化マイクロビーズ」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロビーズに固定化した「抗体固定化マイクロビーズ」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

第1の方法は、下記のような工程から構成される。

（工程1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

（工程2）試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該抗体固定化マイクロビーズとヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該マイクロビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体と試料とを反応させる工程；

（工程3）容器中の内溶液を除去し、ビーズを洗浄する工程；

（工程4）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程5）工程3で洗浄されたビーズを含有する容器に該標識抗体を加え、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスのCTGFとが反応して形成される抗原抗体複合体に該標識抗体を反応させる工程；

(工程6) 容器中の内溶液の除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

(工程7) 工程6で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程5でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程5でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程8) 工程7で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程9) 工程7または工程8の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程10) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

第2の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) 本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

(工程2) 試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該標識抗体とヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該標識抗体と試料とを反応させる工程；

(工程3) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

(工程4) 工程2の反応系に、該ビーズを加え、標識抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスのCTGFとが反応して形成される抗原抗体複合体と、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程5) 容器中の内溶液の除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標

識抗体を取り除く工程；

(工程6) 工程5で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質(但し、工程2でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合)またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン(但し、工程2でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合)を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程7) 工程6で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程8) 工程6または工程7の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程9) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

第3の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

(工程2) 本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

(工程3) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに、工程1で作製された抗体固定化マイクロビーズ、工程2で作製された標識抗体、及びヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体、標識抗体、及び試料を同時に反応させる工程；(工程4) 容器中の内溶液を除去し、該ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

(工程5) 工程4で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質(但し、工程3でペルオキシダーゼ

等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合) またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン (但し、工程 3 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合) を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程;

(工程 6) 工程 5 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程;

(工程 7) 工程 5 または工程 6 の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程; 及び

(工程 8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

一抗体固相法は、前述の本発明の (53) で述べた方法、即ち、少なくとも下記 (a) の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の C T G F の標準物質を反応せしめる工程。

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図 1 に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いて、ヒトまたはマウスの C T G F を定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図 1 に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いて下記と同様に操作することによって、マウスの C T G F だけでなくラット (本願において初めて開示される) の C T G F も定量することができ

る。

(工程 1) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化し、抗体固定化マイクロプレートを作製する工程；

(工程 2) ヒトまたはマウスの C T G F の標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識 C T G F 標準物質を作製する工程；

(工程 3) 該マイクロプレートにヒトまたはマウスの血清等の試料及び該標識 C T G F 標準物質を加え、該試料と標識標準物質とを、該マイクロプレート上に固定化されたモノクローナル抗体と競合的に反応させる工程；

(工程 4) マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識標準物質を、マイクロプレートから取り除く工程；

(工程 5) 工程 4 で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 3 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 3 でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程 6) 工程 5 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程 7) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程 8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

二抗体液相法は、前述の本発明の (54) 及び (55) に記載した方法である。

即ち、第一は、少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能な

シグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質との混合物に、本発明のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

第2は、少なくとも下記(a)乃至(c)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 試料に、本発明のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

(b) (a)の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程；及び

(c) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

本発明に即して、「モノクローナル抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンを用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「モノクローナル抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」を用い、また「標識物質」としてペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンを用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

第1の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程 1) ヒトまたはマウスの C T G F の標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識 C T G F 標準物質を作製する工程；

(工程 2) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に、マウスまたはヒトの血清等の試料と工程 1 で作製された標識 C T G F 標準物質との混合物を加え、次いで本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を加え、該試料と標識 C T G F 標準物質とを競合的に該モノクローナル抗体と反応させる工程；

(工程 3) ヤギ抗マウスγグロブリン血清等のようなマウス由来のモノクローナル抗体に反応性を有するマウス以外の動物由来の抗血清を加え、工程 2 において形成される試料中に含まれる哺乳動物 C T G F 若しくは標識 C T G F 標準物質と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体に該抗血清を反応させ、該複合体と抗血清とからなる複合凝集物を凝集沈殿させる工程；

(工程 4) 工程 3 の反応系を遠心分離して凝集沈殿した複合体を分離する工程；

(工程 5) 工程 4 で分離された複合凝集物に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 2 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 2 でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程 6) 工程 5 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程 7) 工程 5 乃至工程 6 の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程 8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

第 2 の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程 1) ヒトまたはマウスの C T G F の標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識 C T G F 標準物質を作製する工程；

(工程 2) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器にヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、次いで本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を加え、該試料と該モノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程 3) 工程 2 の反応系に、工程 1 で作製した標識 C T G F 標準物質を加え、該標識 C T G F 標準物質と、工程 2 で試料と未反応であった残余のモノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程 4) ヤギ抗マウスγグロブリン血清等のようなマウス由来のモノクローナル抗体に反応性を有するマウス以外の動物由来の抗血清を加え、工程 2 において形成される試料中に含まれる哺乳動物 C T G F と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体、及び／または工程 3 において形成される標識 C T G F 標準物質と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体に、該抗血清を反応させ、該複合体と抗血清とからなる複合凝集物を凝集沈殿させる工程；

(工程 5) 工程 4 の反応系を遠心分離して凝集沈殿した複合体を分離する工程；

(工程 6) 工程 5 で分離された複合凝集物に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 3 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 3 でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程 7) 工程 6 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程 8) 工程 6 乃至工程 7 の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反

応を停止させる工程；及び

（工程 9）比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

本発明における「アフィニティークロマトグラフィー」とは、抗原と抗体、酵素と基質、あるいは受容体とリガンドといった物質間の相互作用（親和性）を利用することにより試料（例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる目的物質を分離または精製する方法を意味する。

本発明の方法は、抗原抗体反応、即ち、抗原としての哺乳動物の C T G F と、哺乳動物の C T G F に反応性を有する本発明のモノクローナル抗体との親和性を利用することにより、試料（例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる C T G F を分離または精製する方法を意味する。

具体的には、（１）前述のような不溶性担体であるフィルターあるいはメンブレン等に哺乳動物の C T G F に反応性を有する本発明のモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を固定化した後、該フィルターあるいはメンブレンに試料を接触させることにより該試料中に含まれる C T G F を分離する方法、及び（２）前述のようなセルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上に本発明の哺乳動物の C T G F に反応性を有するモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を常法により固定化（物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化）し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填し、該カラム（例えば、円柱状カラム）に、試料（例えば、血清若しくは血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）を通じて溶出させることにより、該試料中に含まれる C T G F を分離あるいは精製する方法である。後者（２）の方法を特にアフィニティークロマトグラフィーという。

該アフィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる前記不溶性担体としては、本発明のモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を固定化でき得るものであればどのような不溶性担体でも使用できるが、例えば、市販品である、ファルマシア(Pharmacia)社製の Sepharose 2B、Sepharose 4B、Sepharose 6B、CNBr-activated Sepharose 4B、AH-Sepharose 4B、CH-Sepharose 4B、Activated CH-Sepharose 4B、Epoxy-activated Sepharose 6B、Activated thiol-Sepharose 4B、Sephadex、CM-Sephadex、ECH-Sepharose 4B、EAH-Sepharose 4B、NHS-activated Sepharose あるいは Thiopropyl Sepharose 6B 等、バイオラッド(Bio-Rad)社製の Bio-Gel A、Cellex、Cellex AE、Cellex-CM、Cellex PAB、Bio-Gel P、Hydrazide Bio-Gel P、Aminoethyl Bio-Gel P、Bio-Gel CM、Affi-Gel 10、Affi-Gel 15、Affi-Prep 10、Affi-Gel Hz、Affi-Prep Hz、Affi-Gel 102、CM Bio-Gel A、Affi-Gel heparin、Affi-Gel 501 あるいは Affi-Gel 601 等、和光純薬工業社製のクロマゲル A、クロマゲル P、エンザフィックス P-HZ、エンザフィックス P-SH あるいはエンザフィックス P-AB 等、セルバ(Serva)社製の AE-Cellulose、CM-Cellulose あるいは PAB Cellulose 等を挙げることができる。

本発明における「医薬組成物」は、有効成分としての本発明のモノクローナル抗体若しくはその一部、後述の「CTGF阻害剤」、「CTGF産生抑制剤」または「CTGFの刺激の刺激により増殖する能力を有する細胞のCTGFの刺激による増殖を抑制する能力を有する物質」のいずれかと「薬学的に許容され得る担体」とからなる医薬品として有用な組成物である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。

そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記タンパクや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から 1000mg （あるいは $10\mu\text{g}$ から 500mg ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ ml 担体～ 10mg 抗体/ ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $1\mu\text{g}$ ～ 100mg の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}$ ～ 50mg の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、生体の種々の組織に由来するCTGFの刺激により増

殖する能力を有する細胞（例えば、種々の繊維芽細胞、種々の血管内皮細胞、種々の細胞など）の増殖を抑制するために有用である。該組織としては、例えば、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髓、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管が挙げられる。好ましくは、肺、肝臓、腎臓または皮膚を挙げることができる。

上述したとおり、本発明の医薬組成物は、上記のようなCTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を抑制できることから、本発明の医薬組成物は、また、上記のような種々の組織における該細胞の増殖を伴う種々の疾患の治療または予防のための医薬品として有用である。当該疾患における細胞増殖を伴う組織としては、例えば、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髓、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管が挙げられる。好ましくは、肺、肝臓、腎臓または皮膚を挙げることができる。

該疾患としては、例えば、種々組織における繊維症（腎繊維症、肺繊維症、肝臓における繊維症、皮膚における繊維症など）、腎臓疾患（例えば、腎繊維症、腎炎、腎不全など）、肺における疾患（例えば、肺繊維症、肺炎など）、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイドなど）、肝臓疾患（例えば、肝臓での繊維症、肝炎、肝硬変など）、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ）、種々の癌、あるいは動脈硬化症等の治療または予防への適用が可能である。

好ましくは、腎臓疾患（例えば、腎繊維症、腎炎、腎不全など）、肺における疾患（例えば、肺繊維症、肺炎など）、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイドなど）、あるいは肝臓疾患（例えば、肝臓での繊維症、肝炎、肝硬変など）を挙げることができる。

さらに好ましくは、腎臓疾患（例えば、腎繊維症、腎炎、腎不全など）をあげることができる。

また、本発明の医薬組成物には、「CTGF阻害剤」、「CTGF産生阻害剤」、あるいは「CTGFの刺激の刺激により増殖する能力を有する細胞のCTGFの

刺激による増殖を抑制する能力を有する物質」を含んでなる医薬組成物も包含される。

ここで、該「CTGF阻害剤」、該「CTGF産生阻害剤」あるいは該「物質」とは、CTGFの生物学的機能を抑制または阻害する活性を有する物質または各種細胞からのCTGFの産生を抑制若しくは阻害する活性を有する物質を意味する。例えば下記のいずれかの活性を有する物質を挙げることができる。

(1) ヒト腎臓由来繊維芽細胞（例えば、細胞株 293-T (ATCC CRL1573)) とヒトのCTGFとの結合、または該細胞とマウスのCTGFとの結合を抑制若しくは阻害する。

(2) ラット腎臓由来繊維芽細胞株（例えば、細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570))、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) またはヒト肺由来繊維芽細胞のいずれかとヒトのCTGFとの結合を抑制若しくは阻害する。

(3) ヒトのCTGFまたはマウスのCTGFの刺激によるラット腎臓由来繊維芽細胞株（例えば、細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)) の細胞増殖を抑制若しくは阻害する。

(4) ヒドロキシプロリンの生成が上昇傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの生成の上昇を抑制若しくは阻害する。

上述の「物質」は具体的には、例えば下記のような物質を挙げることができる。

(a) 前述した本発明のモノクローナル抗体（天然由来の抗体若しくは組換え抗体に限らない。）または該抗体の一部。

(b) アンチセンスDNA。

(c) アンチセンスRNA。

(d) 上記(a)乃至(c)以外の低分子化学物質（化学的合成物または天然物）。

本発明におけるアンチセンスDNAとは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするDNAの塩基配列中の部分塩基配列を含むDNA若し

くは該DNAの一部が化学修飾されているDNA、または該部分塩基配列に相補的な塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNAをあげることができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするDNAの塩基配列中に含まれる任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。

該DNAは、該タンパクコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該DNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAのタンパクへの翻訳を阻害することにより、CTGFタンパクの産生を阻害することができる。

該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、このDNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び／または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

本発明におけるアンチセンスRNAとは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするRNAの塩基配列中の部分塩基配列を含むRNA若しくは該RNAの一部が化学修飾されているRNA、または該部分塩基配列に相補的な塩基配列を含むRNA若しくは該RNAの一部が化学修飾されているRNAをあげることができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするRNAの塩基配列中に含まれる任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。

該RNAは、該タンパクコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該DNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAのタンパクへの翻訳を阻害することにより、CTGFタンパクの産生を阻害することができる。

該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、このRNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び／または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更をあげることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは

2'-0-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは 2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

また、本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

例えば、組織繊維症の一つであり、また腎臓疾患の 1 つでもある腎繊維症の治療効果の検討の場合には、マウスの一方の尿管を結紮し腎臓の血液等のろ過機能を停止させることにより腎機能不全を惹起させたモデルマウス (UUO モデル、Unilateral ureteral obstruction) に、本発明の医薬組成物を投与し、該腎機能不全により惹起される腎炎及び腎繊維症の発症の指標であるヒドロキシプロリンの生成の上昇を抑制する程度を測定する方法を用いることができる。該ヒドロキシプロリンの濃度の低減は、該医薬組成物が該腎臓疾患の治療に有効であることを示すものである。

腎疾患、例えば、微小糸球体異常 (例えば、ネフローゼ型微小変化群 (MCNS))、巣状糸球体硬化症 (FGS)、膜性糸球体腎炎 (膜性腎症、MN)、IgA 腎症、メサンギウム増殖性腎炎、溶連菌感染後急性糸球体腎炎 (APSGN)、半月体形成性 (管外性) 腎炎、間質性腎炎、あるいは急性腎不全などについては、既報に詳述されるモデル動物を用いることができる (「疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法」、p.34-46、1993、技術情報協会 (発行))。

皮膚疾患、例えば、創傷、ケロイド、アトピー、皮膚炎、強皮症あるいは乾癬などについては、既報に詳述されるモデル動物を用いることができる (「疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法」、p.229-235、1993、技術情報協会 (発行))。

肝臓疾患、例えば、肝炎 (例えば、ウイルス性肝炎 (A 型、B 型、C 型、E 型など) など)、肝硬変あるいは薬物肝障害などについては、既報に詳述されるモデル動物を用いることができる (「疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法」、p.119-129 及び p.349-358、1993、技術情報協会 (発行))。

例えば、動脈硬化症及び再狭窄への効果の検討の場合には、ラット大動脈にバルーンカテーテルを挿入し PTCA を施し疑似的に作成した再狭窄モデルを使用することができる。

例えば、腫瘍の増殖及び転移への効果の確認の場合には、B a l b / c マウス等の正常マウス、ヌードマウスもしくは S C I D マウス等のモデルマウス等の市販のマウスの例えば皮下、尾静脈、脾臓内、腎被膜下、腹腔内あるいは盲腸壁内等に、癌細胞を移植することにより作製した癌転移モデルを用いることができる。

本発明の「ラットの C T G F」（具体的には、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する）及び「ラットの C T G F をコードする D N A」（具体的には、配列番号 1 に記載される塩基配列中の塩基番号 213 乃至 1256 迄の塩基配列を含む D N A）は、下記のような意味を以て定義されるとともに、下記に述べるような常法に従って製造することができる。

なお、「実質的に同一」なる用語は前述のと通りの意味を有する。

本発明の「ラットの C T G F」は、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明の「D N A」は、本発明のラットの C T G F をコードする D N A であって、本発明のラットの C T G F をコードし得るいかなる塩基配列をも包含する。具体的には、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする D N A が挙げられる。好適な態様としては、配列番号 1 に記載される塩基配列中の塩基番号 213 乃至 1256 迄の塩基配列を含む D N A（例えば、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する D N A）が挙げられる。

本発明におけるラットの C T G F をコードする D N A としては、c D N A 及びゲノミック D N A のいずれをも包含する。

本発明においては、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコ

ドンから構成されるDNAを含む。

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA(cDNA)、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

本発明におけるラットのCTGFをコードするDNAは、常法に従って、該ラットのCTGFをコードするmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、該cDNA配列若しくはmRNA配列を鋳型としてPCRにより調製する方法、または化学合成する方法等により取得することができる。

本発明のラットのCTGFをコードするDNAは、そのようにして調製した該ラットのCTGFをコードする各々のDNAを適切な制限酵素による切断(消化)し、得られたDNA断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ(Tag)と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結することにより調製することができる。

該ラットのCTGF(以下、目的蛋白という)をコードするcDNAをmRNAからクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

まず、目的蛋白を発現・産生する組織あるいは細胞(例えば、ラット線維芽細胞など)から目的蛋白をコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法(チャーグウィン(Chirgwin)ら、バイオケミストリー(Biochemistry)、第18巻、第5294頁、1979年)、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ(dT)セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の

方法、例えばオカヤマらの方法（モレキュラーセルバイオロジー（Mol. Cell. Biol.）、第2巻、第161頁、1982年及び同誌 第3巻、第280頁、1983年）やホフマン（Hoffman）らの方法（ジーン（Gene）、第25巻、第263頁、1983年）等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクターまたはコスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入（トランスフェクト）することによりcDNAライブラリーを作製する。

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpUC19、λgt10、λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で目的蛋白をコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス（Maniatis）らの方法（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、第1.53頁、1989年）に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン（Hyunh）らの方法（DNAクローニング、プラクティカルアプローチ（DNA Cloning, a practical approach）、第1巻、第49頁、1985年）などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット（例えば、宝酒造社製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞（例えば、E. coli: HB101、DH5α、Y1090、DH10BまたはMC1061/P3等）等の適当な宿主に導入する。

プラスミドを宿主に導入する方法としては、(モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第 1.74 頁、1989 年) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージ DNA をインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット (例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等) を用いることによって簡便に行うことができる。

上記の方法によって作製された cDNA ライブラリーから、目的蛋白をコードする cDNA を単離する方法は、一般的な cDNA スクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

例えば、別個に目的蛋白のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを ^{32}P でラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法 (クランシュタイン (Crunstein) ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第 72 巻、第 3961 頁、1975 年) またはブランクハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory、第 2.108 頁、1989 年) により、目的の cDNA を含有するクローンをスクリーニングする方法、PCR プライマーを作製し目的蛋白の特定領域を PCR 法により増幅し、該領域をコードする DNA 断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

また、cDNA を発現しうるベクター (例えば、 λ gt11 等のファージベクター) を用いて作製した cDNA ライブラリーを用いる場合には、目的蛋白に反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択する

ことができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキシム・ギルバート法（マキシム（Maxam）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第560頁、1977年）あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法（サンガー（Sanger）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第5463～5467頁、1977年）によって決定することができる。目的蛋白をコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

また、前述のような目的蛋白を発現する細胞に由来するゲノムDNAから目的蛋白をコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから目的蛋白をコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

目的蛋白をコードするDNAのPCRによる調製は、該目的蛋白の既知のmRNAまたはcDNA等を鋳型として常法により調製することができる（「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年など）。

また、化学的合成による目的蛋白をコードするDNAの製造は、目的蛋白の塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

本発明のラットのCTGFは、上述に例示した方法を用いて調製したラットのCTGFをコードするDNA（cDNAあるいはイントロンを含むゲノミックD

NA) を、各々適切な制限酵素で切断することにより、該ラットのCTGFコードするDNA断片を得、それらの断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ(Tag)と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結させて得たDNAを用いて、慣用される遺伝子組換え技術を用いて、常法により組換え蛋白として調製することができる。

具体的には下記の例示されるとおりである。即ち、上述のようにして調製したDNAを、下記に詳述するようなベクターに挿入して発現ベクターを作成し、該発現ベクターで後述するような宿主細胞を形質転換して形質転換体を得る。該形質転換体を培養することにより、培養上清中に該目的蛋白を産生させる。培養上清中の該目的蛋白は、カラムクロマトグラフィー等を用いて容易に精製することができる。

本発明は、また本発明のラットCTGFをコードするDNAを含有する発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルスビュー社、ニューヨーク、1985年)。

当該発現ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター(プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA) に本発明のラットCTGFをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、入ファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス (pVL1393、インビトロゲン社製) が例示される。

本発明のラットCTGFをコードするDNAを発現させ該ラットCTGFを生

産させる目的においては、プラスミドベクターが有用である。プラスミドベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で該ラットCTGFをコードする遺伝子を発現し、これらのポリペプチドを生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pcDNA3.1(-)、pEF-BOS (ヌクレイックアシッドリサーチ (Nucleic Acid Research)、第18巻、第5322頁、1990年等) あるいはpME18S (実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等) 等を挙げることができる。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のラットCTGFをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のラットCTGFをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子(マーカー)を含んでいてもよい。

細菌中で本発明のラットCTGFを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno(SD)配列(例えば、AAGGなど)を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。

酵母中で本発明のラットCTGFを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロ

モーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、S L 0 1 プロモーター、S P 0 2 プロモーター、p e n P プロモーターなどが挙げられる。

また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、S V 4 0 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、S V 4 0、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (A T G) が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、T A G、T A A、T G A) が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント) および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E.coli ではプラスミド p B R 3 2 2、もしくはその人工的修飾物 (p B R 3 2 2 を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント) が、酵母では酵母 2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミド p R S V n e o ATCC 37198、プラスミド p S V 2 d h f r ATCC 37145、プラスミド p d B P V - M M T n e o ATCC 37224、プラスミド p S V 2 n e o ATCC 37149、プラスミド p S V 2 b s r 等があげられる。

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれS V 4 0 に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性

遺伝子等が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のリストリクシオンサイトなど）を用いることができる。

本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌 (DH5 α 、DH10B、TB1、HB101、XL-2Blue 等)、マウス由来細胞 (COP、L、C127、Sp2/0、NS-1 または NIH3T3 等)、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞 (BHK および CHO 等)、サル由来細胞 (COS1、COS3、COS7、CV1 及び Velo 等) およびヒト由来細胞 (Hela、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞および Namalwa 等) などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を

用いて行うことができる。

例えば、細菌 (*E. coli*、*Bacillus subtilis* 等) の場合は、例えば Cohen らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第 69 巻、第 2110 頁、1972 年)、プロトプラスト法 (Mol. Gen. Genet.、第 168 巻、第 111 頁、1979 年) やコンピテント法 (ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.))、第 56 巻、第 209 頁、1971 年) によって、*Saccharomyces cerevisiae* の場合は、例えばハイネン (Hinnen) らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第 75 巻、第 1927 頁、1978 年) やリチウム法 (J. Bacteriol.、第 153 巻、第 163 頁、1983 年) によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム (Graham) の方法 (バイロロジー (Virology)、第 52 巻、第 456 頁、1973 年)、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ (Summers) らの方法 (Mol. Cell. Biol.、第 3 巻、第 2156～第 2165 頁、1983 年) によってそれぞれ形質転換することができる。

本発明のラット CTGF は、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞 (以下、形質移入体を包含する意味で使用する。) を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、宿主細胞 (形質転換体) の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素 (例えば、無機塩 (例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質 (例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等) など) を含んでもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温

度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

宿主がE.coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(ミラー(Miller)ら、Exp. Mol. Genet. Cold Spring Harbor Laboratory、第431頁、1972年)、YT培地等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder 最小培地 (ボスチアン(Bostian)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第77巻、第4505頁、1980年)が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science)、第122巻、第501頁、1952年)、DMEM培地 (バイロロジー (Virology)、第8巻、第396頁、1959年)、RPMI 1640培地 (J. Am. Med. Assoc.、第199巻、第519頁、1967年)、199培地 (proc. Soc. Exp. Biol. Med.、第73巻、第1頁、1950年)、HamF12培地等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含む Grace's 培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第82巻、第8404頁、1985年) 等が挙げられ、そのp

Hは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明のラットCTGFは、上述のような形質転換細胞（特に動物細胞または大腸菌）を培養することにより、培養上清中に分泌させることにより製造することができる。即ち、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明のラットCTGFを精製、単離する。

単離、精製方法としては、例えばアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

一方、本発明のラットCTGFが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明のラットCTGFを含有する膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

本発明における「トランスジェニックマウス」は、上述のような方法に従って調製できるヒトCTGFをコードするDNA（cDNAまたはゲノミックDNA）がマウスの内在性遺伝子座上にインテグレート（integrate）されているトランスジェニックマウスであり、該トランスジェニックマウスは、体内にヒトC

TGFを発現、分泌する。

該トランスジェニックマウスは、前述したようなトランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）のから取得したES細胞（embryonic stem cell）を、該ヒトCTGFをコードする遺伝子が発現可能なように挿入された発現ベクターで形質転換する。ヒトCTGFをコードする遺伝子が内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞を常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980；米国特許第4,873,191号公報）。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれる。該キメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ（heterogeneous）トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ（homogeneous）トランスジェニックマウスが得られる。」

図面の簡単な説明

図1は、ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の特性を示す図である。

図2は、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の特性を示す図である。

図3は、ヒト、マウス及びラットのいずれのCTGFにも反応性を有するモノクローナル抗体 8-86-2 を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した組換えヒトCTGF、組換えマウスCTGF及び組換えラットCTGFのSDS ポリ

アクリルアミドゲルでの電気泳動の状態を示す図である。

図4は、ヒト、マウス及びラットのいずれのCTGFにも反応性を有するモノクローナル抗体 8-86-2 を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した組換えヒトCTGF、組換えマウスCTGF及び組換えラットCTGFの、ラット腎臓由来線維芽細胞 NRK-49F の細胞増殖促進活性を示す図である。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての [^3H] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各々の組換えCTGFの濃度を示す。

図5は、ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のヒトCTGFに対する反応性を示す図である。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のヒトCTGFにおける ELISA で試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図6は、ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のマウスCTGFに対する反応性を示す図である。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のマウスCTGFにおける ELISA で試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図7は、ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のラットCTGFに対する反応性を示す図である。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のラットCTGFにおける ELISA で試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図8は、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体のヒトCTGFに対する反応性を示す図である。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のヒトCTGFにおける ELISA で試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図9は、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体のマウスCTGFに対する反応性を示す図

である。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のマウス C T G F における ELISA で試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図 10 は、ヒト C T G F をヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体のラット C T G F に対する反応性を示す図である。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のラット C T G F における ELISA で試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図 11 は、ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T とヒト C T G F またはマウス C T G F との接着に対する、ヒト C T G F またはマウス C T G F を各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の阻害活性を示す図である。

縦軸は阻害活性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。

図 12 は、ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F とヒト C T G F の接着に対する、ヒト C T G F をヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図である。

縦軸は細胞結合率 (%) を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。なお、加えた細胞の総数を 100% とした。

図 13 は、ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 またはヒト肺由来線維芽細胞の各々とヒト C T G F の接着に対する、ヒト C T G F をヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図である。

縦軸は細胞結合率 (%) を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。なお、加えた細胞の総数を 100% とした。

図 14 は、ヒト C T G F またはマウス C T G F を各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の動脈硬化症モデルウサギ WHHL の動脈硬化巣組

組織切片への反応性を示す該組織の染色状態を示す図である。

分図 (a) は対照試験での染色状態を示し、分図 (b) はモノクローナル抗体 B35.1 での試験での染色状態を示し、分図 (c) はモノクローナル抗体 B29.6 での試験での染色状態を示し、分図 (d) はモノクローナル抗体 13-51-2 での試験での染色状態を示し、分図 (e) はモノクローナル抗体 A4.3 での試験での染色状態を示し、分図 (f) はモノクローナル抗体 C114.4 での試験での染色状態を示し、分図 (g) はモノクローナル抗体 A11.1 での試験での染色状態を示し、分図 (h) はモノクローナル抗体 A29.6 での試験での染色状態を示し、また分図 (i) はモノクローナル抗体 C26.11 での試験での染色状態を示す。

図 15 は、精製ヒト CTGF の刺激によるラット腎臓由来繊維芽細胞株 NRK-49F の細胞増殖に対する、ヒト CTGF をヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図である。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての [^3H] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各種濃度の精製ヒト CTGF を用いて試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図 16 は、精製ヒト CTGF の刺激によるラット腎臓由来繊維芽細胞株 NRK-49F の細胞増殖に対する、ヒト CTGF をヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図である。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての [^3H] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各種濃度の精製ヒト CTGF を用いて試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図 17 は、ヒト CTGF をヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の、腎臓疾患及び組織繊維症に対する治療効果を示す図である。

縦軸は、疾患症状の進行の指標となるヒドキシプロリンの濃度を示し、横軸は投与したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

図18は、抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするDNA配列の決定の手順を模式的に示す図である。

図19は、モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した標準ヒトCTGF、標準マウスCTGF及び標準ラットCTGFの検量線を示す図である。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は標準CTGFの濃度を示す。

図20は、モノクローナル抗体13-51-2及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した標準ヒトCTGF、標準マウスCTGF及び標準ラットCTGFの検量線を示す図である。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は標準CTGFの濃度を示す。

図21は、モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した胆道閉鎖症患者的の各種血清検体中に含まれるCTGF濃度を示す図である。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体群の種類を示す。
なお、第1群（I）は臨床所見は正常な患者の検体であり、第2群（II）は症状進行中の患者の検体であり、また第3群（III）は肝臓移植を必要とする重症患者の検体である。

図22は、モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した各種患者の血清検体中に含まれるCTGF濃度を示す図である。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体を採取した患者が罹患している疾患名を示す。

図23は、モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した慢性関節リウマチ患者及び変形性関節症患者的の関節液検体中に含まれるCTGF濃度を示す図である。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体を採取した患者が罹患している疾患名を示す。

図 2 4 は、ヘパリンカラムで精製したヒト胎児皮膚由来繊維芽細胞由来のヒト C T G F 画分のウェスタンブロッティングを行った結果を示す SDS ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動図である。

レーン 1、2 及び 3 は、各々 0.2、0.6 及び 2.0M NaCl による溶出画分のプレイムニオン抗体（正常ウサギの免疫前血清）を用いた時の電気泳動図ならびにレーン 4、5 及び 6 は各々 0.2、0.6 及び 2.0M NaCl による溶出画分の抗ヒト C T G F ポリクローナル抗体を用いた時の電気泳動図である。

図 2 5 は、ヘパリンカラムで精製したヒト胎児皮膚由来繊維芽細胞由来のヒト C T G F（0.6M NaCl 溶出画分の 10、30、100 及び 300 倍希釈物）のラット腎臓由来繊維芽細胞株 NRK-49F に対する細胞増殖促進活性を示す図である。

図中、P D G F は陽性対照試験として P D G F を用いた時の結果を、N C は陰性対照試験として C T G F サンプルを添加しない時の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

実施例 1 ヒト C T G F に対するポリクローナル抗体の調製

ヒト C T G F の第 242 乃至第 252 番目のアミノ酸配列（Cys-Glu-Ala-Asp-Leu-Glu-Glu-Asn-Ile-Lys）にあたるペプチドを、ペプチドシンセサイザー（Applied Biosystems 社製）を用いて常法に従って合成した。免疫感作抗原としては、該ペプチドをフロインド完全アジュバント（Freund's complete adjuvant）とともにエマルジョン化したものを用いた。該ペプチド（0.32mg/kg）を、ニュージーランドホワイトウサギ（N Z W、Simunek, Inc. 製）の皮下に 1 日目（0.8mg）、14 日目（0.8mg）、35 日目（0.8mg）及び 49 日目（0.8mg）という間隔及び量で投与した。該ペプチドを用いて、適宜、血清中の抗体価を測定した。次いで、常法により血清を取得し、該ペプチドをカップリングさせたアガロースを用いたアフィ

ニティークロマトグラフィーにより該血清から、ヒトCTGFに対するポリクローナル抗体 (IgG) を精製した。ヒトCTGFに対する反応性を、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 及びウェスタンブロッティングにより確認した。

実施例2 組換えヒトCTGFの調製

<2-1>ヒト腎臓由来線維芽細胞株293での一過性発現

ヒトCTGFをコードするcDNAをPCR法を用いて常法により調製した。具体的には、ヒト軟骨腫細胞株HCS2/8から調製したcDNAを鋳型とし、ヒトCTGFのcDNA (The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991) を基に設計したプライマーを用いて合成した。得られた翻訳領域を含むヒトCTGFのcDNAをプラスミドpcDNA3.1(-) (Invitrogen社製) に挿入し発現ベクターを作成し、エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) を形質転換した。形質転換細胞を、無血清培地ASF104 (味の素社製) 中で3日間培養し、組換えヒトCTGFを一過性に発現させた。ヒトCTGFの発現を、実施例1で調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養上清を回収し、硫酸アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ヒトCTGF画分を得た。

<2-2>ヒト上皮様細胞株Helaでの安定発現

実施例<2-1>と同様の方法により、ヒトCTGFをコードするcDNAをPCR法を用いて常法により調製した。得られた翻訳領域を含むヒトCTGFのcDNAをプラスミドpcDNA3.1(-) (Invitrogen社製) に挿入し発現ベクターを作成し、エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト上皮様細胞株Hela (ATCC CCL-2) を形質転換した。形質転換細胞を、Geneticin (0.8mg/ml; GIBCO-BRL社製) 及び10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum) を含有するRPMI1640

培地中で約2週間培養することにより、Geneticin 耐性形質転換細胞クローンを選別した。選別された形質転換細胞を、無血清培地 ASF104 (味の素社製) 中で培養し、組換えヒトCTGFをに発現させた。ヒトCTGFの発現を、実施例1で調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養上清を回収し、硫酸アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ヒトCTGF画分を得た。

実施例3 組換えマウスCTGFの調製

既報のマウスCTGFをコードするcDNA配列 (特開平 5-255397 号公報、Cell Growth Differ., Vol.2, No.5, p.225-233, 1991; FEBS Letters, Vol.327, No.2, p.125-130, 1993; 及びDNA Cell Biol., Vol.10, No.4, p.293-300, 1991を参照。) に基づき、実施例2と同様にして部分精製組換えマウスCTGFを調製した。

実施例4 抗ヒトCTGFモノクローナル抗体並びに抗マウスCTGFモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、実験医学 (別冊) 細胞工学ハンドブック (黒木登志夫ら編集、羊土社発行、第66～第74頁、1992年) 及び単クローン抗体実験操作入門 (安東民衛ら著作、講談社発行、1991年) 等に記載されるような一般的方法に従って調製した。

免疫原としてのヒトCTGFは、実施例2で2種類の方法を用いて調製した組換えヒトCTGFのいずれか、またはそれらの混合物を用いた。またマウスCTGFは、実施例3で調製した組換えマウスCTGFを用いた。

被免疫動物としては、①正常マウス (BALB/c マウス、雌、4～5週齢、静岡研究動物センター (製))、②正常ラット (Wistar ラット、雌、4～5週齢、静岡研究動物センター (製))、③正常ハムスター (Armenian ハムスター、雄、4～5週齢、オリエンタル酵母 (製)) 並びに④前述の方法を用いて製造したヒト抗体産生

トランスジェニックマウス (Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994 ; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997 ; 特表平 4-504365 号公報 ; 特表平 7-509137 号公報 ; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年等に記載の方法に従って作製した。)を用いた。

特に断わりのない限り、いずれの動物を用いた場合のモノクローナル抗体の作製も同一の方法を用いた。また、細胞培養操作は、マルチウェルマイクロプレートを用いて行った。

<4-1> 抗ヒトCTGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記の正常マウス及びヒト抗体産生トランスジェニックマウスの各々に、実施例2で調製した部分精製組換えヒトCTGF ($1\mu\text{g}/\text{匹}$) を、完全フロインドアジュバント (Complete Freund's Adjuvant) とともにフッドパッド内注射することにより初回 (0日) 免疫した。初回免疫から1週間毎に同組換えヒトCTGF をフッドパッド内注射により4回以上追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同様にして最終免疫した。

各々の動物から採取したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000またはポリエチレングリコール1500 (GIBCO 社製) を用いて細胞融合させることによりハイブリドーマを作製した。なお、正常マウスのリンパ節細胞の細胞融合は、マウスミエローマPAI (JCR No.B0113 ; Res. Disclosure Vol. 217, p.155, 1982) を用い、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのリンパ節細胞の細胞融合は、マウスミエローマ P3/X63-AG8.653 (ATCC No.: CRL 1580) を用いた。

ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素 (製)) 中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマクローンの培養上清の、免疫原として用いた組換えヒトCTGFに対する反応性を、後述するELISAにより測定することにより各々

の動物種について多数の抗体産生ハイブリドーマを得た。

正常マウス（マウス抗ヒトCTGFモノクローナル抗体）については、8-64-6、8-86-2、8-97-3、8-149-3 及び 15-38-1 と命名したクローンを得た（図1）。

ハイブリドーマクローン 8-86-2 及び 8-64-6 は共に、平成9年12月18日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に国際寄託した（クローン 8-86-2：国際寄託番号 FERM BP-6208；クローン 8-64-6：国際寄託番号 FERM BP-6209）。

ヒト抗体産生トランスジェニックマウス（ヒト抗ヒトCTGFモノクローナル抗体）については、A4.3、A11.1、A15.1、A29.6、B13.7、B22.2、B29.6、B35.1、C2.1、C26.11、C59.1、C114.4、M32.2、M33.3、M84.4、M107.2、M122、M124.6、M194.2、M244、M255、M268.1、M288.5、M291.2、M295.2、M315、M320.2、N45.2、N50.1 及び N60.1 と命名したクローンを得た（図1 及び図2）。

ハイブリドーマクローン A11.1 は、平成10年9月25日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に国際寄託した（国際寄託番号 FERM BP-6535）。

また、ハイブリドーマクローン B22.2、M84.4 及び M320.2 は共に、平成10年12月15日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に国際寄託した（クローン B22.2：国際寄託番号 FERM BP-6598；クローン M84.4：国際寄託番号 FERM BP-6599；クローン M320.2：国際寄託番号 FERM BP-6600）。

なお、上記に示したとおり、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに当該実施例における試験結果として示した図面または表中においては、本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを、記号を用いて命名した。

当該記号中のピリオド記号より前に記載したアルファベットと数字は合わせて親クローンの名前を表す。また、上記各々の親クローンからサブクローニングさ

れたハイブリドーマクローンは、その親クローン名の直後のピリオド記号の次にさらなる番号を付加することによって命名した。

なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに当該実施例における試験結果として示した図面または表中においては、当該サブクロニングによる番号を省略して記載する場合があるが、それらのいずれも図1または図2に記載したクローンと同一の細胞である。

<4-2> 抗マウスCTGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記の正常ラット及び正常ハムスターに、実施例3で調製した部分精製組換えマウスCTGF ($2\mu\text{g}/\text{匹}$) を、完全フロインドアジュバント (Complete Freund's Adjuvant) とともにフッドパッド内注射することにより初回 (0日) 免疫した。初回免疫から一週間毎に4回以上同組換えマウスCTGFをフッドパッド内注射により追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同様にして最終免疫した。

各々の免疫感作動物の膝窩リンパ節細胞を常法に従って外科手術により採取した。

各々の動物から採取したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞PAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure Vol. 217, p.155, 1982) とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール 4000 またはポリエチレングリコール 1500 (GIBCO 社製) を用いて細胞融合させることによりハイブリドーマを作製した。

ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素 (製)) 中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマクローンの培養上清の、免疫原として用いた組換えマウスCTGFに対する反応性を、後述するELISAにより測定することにより各々の動物種について多数の抗体産生ハイブリドーマを得た。

正常ラット (ラット抗マウスCTGFモノクローナル抗体) については、13-51-2、

17-132、23-96、24-53、24-67、25-91、25-101、25-256、25-338、25-410 及び 25-463 と命名したクローンを得た (図 1)。

正常ハムスター (ハムスター抗マウス CTGF モノクローナル抗体) については、2-228-1 と命名したクローンを得た (図 1)。

< 4-3 > モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの ELISA によるスクリーニング

実施例< 4-1 > 及び< 4-2 >で行った ELISA は、下記のとおりである。

実施例 2 で調製した組換えヒト CTGF ($0.2\mu\text{g}$ /ウェル) または実施例 3 で調製した組換えマウス CTGF ($0.2\mu\text{g}$ /ウェル) を、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (コーニング (Corning) 社製) の各ウェルに加え、室温で 2 時間インキュベートし、組換えヒト CTGF または組換えマウス CTGF をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルに、ブロッキング試薬 ($200\mu\text{l}$ 、3% BSA 含有リン酸緩衝液) を加え室温で 2 時間インキュベートし、CTGF が結合していない部位をブロックした。各ウェルを、0.1% の Tween20 を含有するリン酸緩衝液 $200\mu\text{l}$ で 3 回洗浄した。このようにして、各ウェルを組換えヒト CTGF または組換えマウス CTGF でコーティングしたマイクロプレートを作製した。

各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 ($100\mu\text{l}$) を加え、40 分間反応させた後、各ウェルを、0.1% の Tween20 を含有するリン酸緩衝液 $200\mu\text{l}$ で 3 回洗浄した。

次いで、正常マウス由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体 ($50\mu\text{l}$ 、アマシャム社製) を、正常ラット由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヒツジ抗ラットイムノグロブリン抗体 ($50\mu\text{l}$ 、アマシャム社製) を、正常ハムスター由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識し

たヤギ抗ハムスターイムノグロブリン抗体 (50 μ l、Cedarlane 社製) を、またヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体 (50 μ l、アメリカンコーレックス社製) を加え、室温下で1時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1%Tween20 を含有するリン酸緩衝液で洗浄後、ウシ血清アルブミン (BSA、1mg/ml) を含有する 0.5M の NaCl と 20mM の HEPES からなる溶液 (pH7.0) で 1000 倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、Gibco BRL 社製)) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

次いで、マイクロプレートを、0.1%Tween20 を含有するリン酸緩衝液で洗浄後、1mg/ml の BSA を含有する 100mM の NaCl、1mM の $MgCl_2$ 及び 10mM のリン酸緩衝液からなる溶液 (pH7.0) で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。各ウェルに、1M の Na_2CO_3 (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長 460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。

<4-4> モノクローナル抗体の大量調製

ICRヌードマウス (雌、7~8週齢、チャールズリバー社製) に、前記の各々のハイブリドーマクローン (各々 $10^6 \sim 10^7$ 個/0.5ml/マウス) を、腹腔内注射した。10~20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法により採取した腹水から各々のモノクローナル抗体を大量に調製した。

<4-5> モノクローナル抗体の精製

前記<4-4>で取得した各々のモノクローナル抗体腹水を遠心して得た遠心

上清を、0.06Mの酢酸緩衝液(pH4.0)で3倍に希釈し、1Nの塩酸を加えpHを4.8に調整した。次いで、カプリル酸(Caprylic acid、和光純薬工業製)を、腹水1mlに対して0.033mlになるように室温下で攪拌しながら少しずつ加え、攪拌しながら30分間反応させた。次いで、遠心分離(10,000rpm、20分間)し、抗体以外の蛋白を沈殿させた。遠心上清を回収し、フィルター(ミリポア社製)で濾過し、白沈を除いた。得られた濾液を、リン酸緩衝液で透析(2時間)した。

透析後、硫酸アンモニウム(26.2g/100ml)を攪拌しながら少しずつ加え、攪拌しながら4℃で120分間反応させた。次いで、遠心分離(10,000rpm、20分間)して、沈殿物を回収した。回収した沈殿物に、リン酸緩衝液を加え、リン酸緩衝液で透析(4℃、24時間)し、各々の精製モノクローナル抗体を得た。

<4-6> アイソタイプの決定

マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット(アマシャム社製)を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、前述の正常マウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体(8-64-6、8-86-2、8-97-3、8-149-3及び15-38-1)の各々のアイソタイプを決定した。いずれもIgG1/ κ であることが確認された(図1)。

ヒトモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット(アメリカン・コーレックス社製)を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、前述のヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来のヒト抗ヒトCTGFモノクローナル抗体(A4.3、A11.1、A15.1、A29.6、B13.7、B22.2、B29.6、B35.1、C2.1、C26.11、C59.1、C114.4、M32.2、M33.3、M84.4、M107.2、M122、M124.6、M194.2、M244、M255、M268.1、M288.5、M291.2、M295.2、M315、M320.2、N45.2、N50.1及びN60.1)の各々のアイソタイプを決定した。いずれもIgG2/ κ であることが確認された(図1及び図2)。

<4-7> アフィニティーカラムの作製

NHS活性化ハイトラップカラム(HiTrap-NHS-activated Sepharose HP、5ml、

ファルマシアバイオテック社製)を用い、添付のプロトコールに従ってアフィニティーカラムを作製した。具体的には、下記のとおりである。

0.5MのNaClを含有する0.2Mの炭酸水素ナトリウム溶液(pH8.3)中に溶解した実施例<4-5>で調製したモノクローナル抗体8-86-2(10mg/ml セファロー)を、NH S活性化ハイトラップカラムに注入した。20℃で45分間反応させ、モノクローナル抗体8-86-2をNH S活性化セファローに固定化した。

モノクローナル抗体8-86-2は、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有するため、この抗体を用いたアフィニティーカラムを作製することにより、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれも精製することが可能である。

<4-8> アフィニティークロマトグラフィーによる哺乳動物CTGFの精製

ヒトCTGFを発現する形質転換Hela細胞(実施例<2-2>)、マウスCTGFを発現する形質転換Hela細胞(実施例3)及びラットCTGFを発現する形質転換Hela細胞(実施例<11-2>)の各々の培養上清を回収し、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.7MのNaCl/PBSで溶出し、ヒト、マウス及びラットのCTGF各々の粗精製画分を得た。

各々の粗精製物を、実施例<4-7>で作製した抗CTGF抗体8-86-2を固定化したアフィニティークラムに加え、リン酸緩衝液で洗浄した後、0.1Mのグリシン緩衝液(pH2.5)で溶出し、0.75MのTris緩衝液(pH9.0)で中和した。集めた溶出物をリン酸緩衝液で透析し、高純度精製された組換えヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFを得た。

各々の精製組換えCTGFを、10乃至20%の濃度勾配のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。分離したバンドを銀染色した結果、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれについても約38kDa付近にバンドが検出された(図3)。

<4-9> 精製CTGFの細胞増殖促進活性の試験

実施例<4-8>で精製した各種組換えCTGFが生物活性を保持しているか否かを確認するため、各々の精製CTGFの細胞増殖促進活性を調べた。

96マイクロプレートを用いて、ラット腎臓線維芽細胞 NRK-49F (ATCC CRL-1570; 2×10^3 /ウェル) を、10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有DMEM培地中で3日間培養した。培養上清を取り除き、DMEM培地で1回洗浄後、DMEM培地中で1日培養した。次いで、各々の培養系に各種濃度 (100、50、25、12.5、6.3 及び 3.1ng/ml) の精製組換えCTGFを添加して2日間培養した後、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine (3.7kBq/ウェル) を添加してさらに6時間培養した。細胞を回収 (ハーベスト) して、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -Thymidine の量を液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) にて測定した。なお、対照として、CTGFを添加せず同様にして培養した場合の $[^3\text{H}]$ -Thymidine の取込みを測定した。

結果を図4に示す。ヒト、マウス及びラットのいずれの精製組換えCTGFも、濃度依存的な細胞増殖促進活性を示し、いずれの組換えCTGFも生物学的機能を保持していることが示された。

<4-10> 交叉反応性

前述のようにして調製した種々の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体 (10 μ g/ml) 及び抗マウスCTGFモノクローナル抗体 (10 μ g/ml) のヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFの各々に対する反応性を、実施例<4-3>に述べたELISAと同様にして調べた。

なお、本試験では、実施例<4-7>で作製したアフィニティーカラムを用いて精製したヒト、マウス及びラットの精製組換えCTGFの各々を、(A) 100、30 及び 10ng/well、または (B) 100、10 及び 1ng/well の濃度でコーティングしたマイクロプレートを用いた。

なお、(B) の試験においては、陰性対照試験として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH (keyhole limpet hemocyanin、ピアース (PIERCE) 社製) を免疫して調製した抗KLHヒトモノクローナル抗体を用いて、前

記と同様にして試験を行った。

濃度（A）での試験結果を図5乃至図7に、また濃度（B）での試験結果を図8乃至図10に示す。

また、図5乃至図10に示した結果を、図1及び図2の「交叉反応性」の欄に簡略化して示した。

図1の「交叉反応性」の欄においては、左から順に、コーティング濃度が、100、30及び10 ng/wellでの結果を示す。各濃度における反応性は、蛍光強度が1000以上の場合には「○」を、500以上1000未満の場合には「△」を、また500未満の場合には「×」を付した。

図2の「交叉反応性」の欄においては、左から順に、コーティング濃度が、100、10及び1 ng/wellでの結果を示す。各濃度における反応性は、蛍光強度が1000以上の場合には「○」を、500以上1000未満の場合には「△」を、また500未満の場合には「×」を付した。

本発明のモノクローナル抗体は、様々な交叉反応性の特徴を有することが示された。

<4-11> CTGFと種々細胞との結合の阻害活性

最近の研究によりCTGFが細胞接着に関与することが明らかになっている(Exp. Cell. Res., Vol.233, p.63-77, 1997)。そこで、前記のようにして調製した種々のモノクローナル抗体がCTGFの機能を阻害する活性（中和活性）を有するか否かを、CTGFが媒介する細胞接着作用に対する阻害効果を指標に調べた。試験は下記<4-11-1>乃至<4-11-3>に記載する3種類の方法を用いた。

<4-11-1> ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-Tとの結合の阻害

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート（コーティング濃度：0.5 µg/well）の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のモノクローナル抗体（0.5 µg/well）を加えた。また、実施例<4-3>と同様にして作製した組換えマウスCTGF固

定化マイクロプレート（コーティング濃度：0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）の各ウェルに、前記のようにして調製したマウスCTGFに反応性を有する各種のモノクローナル抗体（0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）を加えた。

各プレートの上清を除いた後、各ウェルに BCECF（2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester、モレキュラープローブ社）で標識したヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) ($5 \times 10^4/\text{ウェル}$) を加え、4°Cで1時間静置した。

浮遊細胞を除去し、1%NP-40 含有リン酸緩衝液（100 μl ）を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出される BCECF の蛍光強度をフルオロスキャン II マイクロプレートフルオロメーター（Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所（Flow Laboratories Inc.）（製））を用いて測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。

結果を図11に示す。また、図11の結果を図1の「293細胞の結合阻害活性」の欄に簡略化して示した。図1の当該欄においては、「○」は有意差をもって細胞の接着を阻害する活性を示したこと示し、また「×」印は、該活性を示さなかったことを示す。

<4-11-2> ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F との結合の阻害

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート（コーティング濃度：1 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のヒトモノクローナル抗体（最終濃度：20、6または2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加えた。

次いで、各ウェルに BCECF（2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester、モレキュラープローブ社）で標識したラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL1570) ($1 \times 10^4/\text{ウェル}$) を

加え、4℃で1時間静置した。

浮遊細胞を除去し、1%NP-40 含有リン酸緩衝液(100 μ l)を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出される BCECF の蛍光強度をフルオロスキャン II マイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) を用いて測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。陰性対照試験として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH(keyhole limpet hemocyanin、ピアース(PIERCE)社製)を免疫して調製した抗KLHヒトモノクローナル抗体を用いて、前記と同様にして試験を行った。

また、別の対照試験として、CTGFをコーティングしないマイクロプレートウェルを用いて、且ついずれの抗体も加えないで前記と同様にして試験を行った。

結果を図12に示す。なお、結果は、求められた蛍光強度の値を基に、細胞の結合率(%)に換算して示した。

また、図12の結果を図2の「NRK-49F 細胞の結合阻害活性」の欄に簡略化して示した。図2の当該欄における「○」印は、有意差をもって細胞の接着を阻害したことを示し、「×」印は、当該阻害活性が弱いかまたは阻害活性を示さなかったことを示す。

<4-11-3> 種々細胞との結合の阻害

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート(コーティング濃度: 1 μ g/well)の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のヒトモノクローナル抗体(最終濃度: 20 μ g/ml)を加えた。

60分静置後、各プレートの上清を除いた後、各ウェルに BCECF (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetra-acetoxymethyl ester、モレキュラープローブ社)で標識した下記細胞(各々 1×10^4 /ウェル)を加え、

4℃で1時間静置した。細胞は下記を用いた。

- (1) ヒト肺由来繊維芽細胞 (NHLF2837; Clonetics 製)。
- (2) ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL1427)。
- (3) ラット腎臓由来繊維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL1570)。

浮遊細胞を除去し、1%NP-40 含有リン酸緩衝液 (100 μ l) を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出される BCECF の蛍光強度をフルオロスキャン II マイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) を用いて測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。陰性対照試験として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH (keyhole limpet hemocyanin、ピアース (PIERCE) 社製) を免疫して調製した抗 KLH ヒトモノクローナル抗体を用いて、前記と同様にして試験を行った。

また、別の対照試験として、CTGF をコーティングしないマイクロプレートウェルを用いて、且ついずれの抗体も加えないで前記と同様にして試験を行った。

結果を図 13 に示す。なお、結果は、求められた蛍光強度の値を基に、細胞の結合率 (%) に換算して示した。

< 4-12 > ウサギ組織への交叉反応性

高脂血症モデルウサギ WHHL (オリエンタル酵母社製) の動脈硬化巣を外科的手術により採取し、常法により動脈硬化症部位の動脈の凍結切片を調製した。

各切片を、下記に述べるようにベクタステインエリート (Vectastain Elite) ABC キット (フナコシ株式会社製) を用いて染色した。

該切片をアセトンで 1~2 分間固定し、乾燥後、希釈血清 (PBS (10ml) / 血清 (150 μ l)) で 30 分間湿潤させた。各切片を PBS で洗浄後、1 次抗体として前述のようにして調製した正常マウス由来の抗ヒト CTGF モノクローナル抗体 (クローン: 8-86-2 及び 8-149-3)、正常ラット由来の抗マウス CTGF モノクロ

ーナル抗体 (クローン : 13-51-2) またはヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体 (クローン : A4.3、A11.1、A29.6、B29.6、B35.1、C26.11 及び C114.4) (各々 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ あるいはハイブリドーマ培養上清) を加え、40 分間静置した。

次いで、PBS で洗浄し、ビオチン化二次抗体溶液 ($100 \mu\text{l}$) を加え、30 分間静置した。なお、一次抗体として正常マウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体を用いた場合は、ビオチン標識ウマ抗マウスイムノグロブリン抗体を、一次抗体として正常ラット由来の抗マウスCTGFモノクローナル抗体を用いた場合は、ビオチン標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体を、また一次抗体としてヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体を用いた場合にはビオチン標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた。

各切片を、メタノール中に溶解した3%過酸化水素溶液中で10分間静置し、PBSで洗浄した後、 $100 \mu\text{l}$ のアビジン-ペルオキシダーゼ溶液 (PBS (5ml) / ペルオキシダーゼ標識アビジンDH ($100 \mu\text{l}$) / ビオチン化過酸化水素H ($100 \mu\text{l}$)) を加え30分間静置した。

PBSで洗浄後、DAB溶液 (水 (5ml) / 緩衝溶液 ($100 \mu\text{l}$) / DAB (ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド) 溶液 ($200 \mu\text{l}$) / 過酸化水素溶液 ($100 \mu\text{l}$)) を加え、2~10分間静置した。

冷水で5分間洗浄した後、ギムザ (Giemsa) 染色法に供し封入処理を行った。なお、1次抗体として、CTGFに対する反応性を有さず、且つアイソタイプの一致したモノクローナル抗体を用いて前記と同様に染色したものを対照とした。染色、封入された各組織切片を100及び200倍の倍率にて顕鏡し、結果を図14に示した。また、図14の結果を図1の「WHHL ウサギの動脈硬化巣組織への反応性」の欄に簡略化して示した。図1の当該欄においては、組織切片が染色された場合は「○」を、組織切片の染色が弱いかまたは染色されなかった場合は「×」を付した。

ヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体であるクローンA4.3、A11.1、A29.6、C26.11及びC114.4、並びに正常ラット由来の抗マウスCTGFモノクローナル抗体であるクローン13-51-2は、ウサギの動脈硬化巣組織に反応性を示した。

<4-13> CTGF刺激による細胞増殖の阻害活性

前記実施例<4-9>の試験で示されたように、CTGFは、各種細胞（例えば、腎臓や肺等の種々組織に由来する繊維芽細胞、各種腫瘍細胞、及び血管内皮細胞など）の細胞増殖を誘導する。

本試験では、本発明のモノクローナル抗体の、そのようなCTGFの刺激による細胞増殖に対する阻害効果を下記のようにして調べた。

<4-13-1> CTGFを含む細胞培養液の調製

ヒト胎児皮膚由来繊維芽細胞(Neonatal human dermal fibroblast, NHDF; Becton Dickinson 製)をシャーレで培養し、ウシ胎児血清(FCS)を含まないDMEM培養液で2回洗浄後、ヒトTGF- β (Transforming growth factor; 1 ng/ml, R&D Systems 製)を含有するDMEM培地を加えさらに1日培養した。

培養上清を回収し、ヘパリンカラム(HiTrap, Pharmacia Biotech 製)に添加した。カラムを0.2MのNaCl/PBSで洗浄後、0.6MのNaCl/PBSでカラムにトラップされた因子を溶出させた。溶出液をPBSで透析し、以下の細胞増殖アッセイに用いた。

CTGFはヘパリン結合性であることから、ヘパリンカラムを用いることによりCTGFを部分精製することができる。実施例1で調製したヒトCTGFに対するウサギポリクローナル抗体を用いて、常法に従ってウェスタンブロッティングを行い、上記で得たサンプル中にCTGFが含まれていることを確認した。

なお、対照試験には、ヒトCTGFで免疫する前に取得したウサギ(実施例1に同じ)の血清を用いた。

結果を図24に示す。

<4-13-2> 精製 C T G F による細胞増殖活性

96穴マイクロタータープレートにラット腎臓由来繊維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570、 1×10^4 個/well) を加え、1日培養した。次いで、プレートを FCS を含まない DMEM 培地で2回洗浄した後、さらに1日培養した。次いで、前記<4-13-1>で調製した C T G F サンプル (DMEM 培地による 10、30、100 または 300 倍希釈物) を各ウェルに加え 18 時間培養した。次いで、各ウェルに、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine (3.7kBq/ウェル) を添加してさらに 6 時間培養した。細胞を回収 (ハーベスト) して、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -Thymidine の量を液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) にて測定した。

なお、陽性対照試験として、PDGF を用いて、同様にして試験を行った。また、陰性対照試験として、C T G F サンプルを添加せず上記と同様にして試験を行った。

結果を図 25 に示す。

<4-13-3> 細胞増殖の阻害活性

前記<4-13-1>で調製した C T G F サンプル (DMEM 培地による 20 倍希釈物) 及び前記で調製した本発明の抗ヒト C T G F ヒトモノクローナル抗体 (最終濃度: 20、2 または $0.2 \mu\text{g/ml}$) とを 30 分間反応させた混合物を用いて、<4-13-2>と同様にして、試験を行った。

なお、陽性対照試験として、いずれの抗体も加えないで同様にして試験を行った。また、陰性対照試験として、C T G F サンプル及びいずれの抗体をも添加せず同様にして試験を行った。

結果を図 15 及び図 16 に示す。

また、前記と同様の複数回の試験を行った結果 (図 15 及び図 16 に示した本試験の結果を含む) を、図 2 の「NRK-49F 細胞の増殖阻害活性」の欄に簡略化して示した。図 2 の当該欄における「○」は、有意差をもって細胞の増殖を阻害する活性を示したことを意味する。

本発明の抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体は、ヒト繊維芽細胞の増殖を有意に抑制または阻害することが示された。

<4-14> エピトープマッピング

本発明の抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体が特異的に結合するヒト CTGF の構造中の部位（エピトープ）を解析する目的で下記の試験を行った。

本試験は、後述の実施例 5 に詳述する 2 種類のモノクローナル抗体を用いた本発明のサンドイッチ ELISA を用いて行った。具体的には下記の工程に従った。

（工程 1）

後述の実施例<5-1>と同様にして図 2 に記載される各々の抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 ($0.3\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{well}$) が固定化された抗体固定化マイクロプレートを作製した。

（工程 2）

後述の実施例<5-2>と同様にして下記 A 乃至 D の各々の本発明のモノクローナル抗体を標識し、標識モノクローナル抗体を作製した。

〔抗体 A〕

ヒト CTGF に反応性を有するマウスモノクローナル抗体 8-64-6（国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別されるハイブリドーマに由来する。）

〔抗体 B〕

抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 A11.1（国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別されるハイブリドーマに由来する。）

〔抗体 C〕

抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 C26.11（配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する重鎖、並びに配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する軽鎖とからなる。）

〔抗体 D〕

抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 C59.1（配列番号 10 に記載されるアミ

ノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する重鎖、並びに配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する軽鎖とからなる。)

(工程 3)

後述の実施例<5-3>と同様にして ELISA を行った。即ち、工程 1 で作製した抗体固定化マイクロプレートの各々に、前記実施例で調製した精製組換えヒト CTGF (15ng/well) を加えて抗原抗体反応を進めた後、工程 2 で調製した各々の標識モノクローナル抗体 (0.1 μ l/50 μ l/well) を加えて反応させた。後述の実施例<5-3>に記載の同様の操作の後、各ウェルに反応停止液を加えて反応を停止させ、波長 460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロメーターにより測定した。

求められる蛍光強度の値は、マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位 (エピトープ) と標識されたモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位 (エピトープ) の異同に依存して、下記 (1) 乃至 (3) のような結果になるものと考えられた。

(1) マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位 (エピトープ) と標識されたモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位 (エピトープ) が同一であるならば、マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体とヒト CTGF とで形成される抗原抗体複合体に、後に加えた標識モノクローナル抗体が結合し得ないことから、工程 3 で測定される蛍光強度の値は極めてゼロに近いこととなる。

(2) マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位 (エピトープ) と標識されたモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位 (エピトープ) が近い位置に存在するならば、マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体とヒト CTGF とで形成される抗原抗体複合体への、後に加えた標識モノクローナル抗体の結合が多少の立体障害を受けることから、工程 3 で測定される蛍光強度の値は低いこととなる。

(3) マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体が結合するヒト

CTGF 上の部位（エпитープ）と標識されたモノクローナル抗体が結合するヒト CTGF 上の部位（エпитープ）が異なるならば、マイクロプレートに固定化したモノクローナル抗体とヒト CTGF とで形成される抗原抗体複合体に、後に加えた標識モノクローナル抗体が結合し得ることから、工程 3 で測定される蛍光強度の値は有意に高い値となる。

本試験の結果は、上記の推定に合致するものであった。結果を図 2 の「エピトープマッピング」の欄に示した。

なお、以下に図 2 における当該欄に示した各々のアルファベットの意味を例示的に示す。

「(A)」: 前記で標識抗体として用いた「抗体 A」であることを意味する。

「(B)」: 前記で標識抗体として用いた「抗体 B」であることを意味する。

「(C)」: 前記で標識抗体として用いた「抗体 C」であることを意味する。

「(D)」: 前記で標識抗体として用いた「抗体 D」であることを意味する。

「A」: 「抗体 A」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「B」: 「抗体 B」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「C」: 「抗体 C」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「D」: 「抗体 D」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「-」: 「抗体 A」、「抗体 B」、「抗体 C」または「抗体 D」のいずれ抗体のエピトープとも異なるエピトープであることを意味する。

「B/C」: 「抗体 B」のエピトープ及び／または「抗体 C」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「A-/B」: 「抗体 A」のエピトープに近い位置のエピトープであり、且つ「抗

体B」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

上記以外の記載方法も、上記と同様な意味を有するものである。

<4-15> 腎臓疾患及び組織繊維症に対する治療効果

本発明の抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体の各種疾患に対する治療効果を当該疾患のマウスモデルを用いて調べた。

本試験で用いたマウスモデルは、下記の疾患あるいは病的状態のいずれにおいても見られる病理学的特徴の一部または臨床所見の一部を呈する疾患モデルであることから、本試験で得られる治療効果は、下記全ての疾患または病的状態の治療効果を代表するものである。

腎臓疾患（腎不全、腎炎、腎繊維症など）、各種組織繊維症（腎繊維症、肺繊維症、肝臓組織での繊維症、皮膚組織での繊維症など、関節リウマチに伴う滑膜組織での繊維症、各種癌に伴う繊維症）、皮膚疾患（強皮症、乾癬、アトピーなど）、肝臓疾患（肝硬変、肝臓組織での繊維症、肝炎など）、肺疾患（肺繊維症、肺炎など）、関節リウマチ、及び動脈硬化症など。

<4-15-1> 疾患マウスモデルの作製

B6C3F1 マウス（雄、7週齢、各群6匹、SLC製）を、ペンタバルビタール（Pentobarbital、50mg/kg）による麻酔下で外科手術により左脇腹を開腹した。次いで、左腎から伸びる尿管の2箇所を縫合糸で結紮し、当該2箇所の結紮部位の間の尿管を切断した（UUO、Unilateral ureteral obstruction）。当該処置の後、開腹部を縫合した。この手術により、当該左腎は、正常な腎臓の最も重要な機能である血液等の体液のろ過機能を失い、種々の腎疾患に見られる様々な病理的症状を発現するようになる。

<4-15-2> 抗CTGFモノクローナル抗体による治療効果

上記で作製した各々のモデルマウスに、リン酸緩衝液に溶解した抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体M84またはM320（前記実施例で調製、各々5mg/kg）を腹腔内投与した。当該抗体投与は、上記手術完了直後に初回投与し、さらに初回

投与から3日おきに合計4回行った。最終投与の後（当該手術完了から14日目）、各々のマウスから当該左腎を外科手術により摘出した。摘出した腎臓をアセトンで脱脂及び脱水した後、6N 塩酸でタンパクを加水分解した。次いで、当該サンプルを温暖な条件下で窒素ガスを当て乾燥させた後、精製水に溶解して定量用のサンプルとした。得られた腎臓組織サンプル中のヒドロキシプロリン（OH-Proline）の濃度を既報の方法に従って測定した（Analytical Biochemistry, Vol.55, p.288-291, 1973; Kidney Int., Vol.54, No.1, p.99-109, 1998）。

該ヒドロキシプロリンの生成の上昇は、腎機能不全により惹起される腎炎及び腎繊維症の発症の指標であり、ヒドロキシプロリン濃度の低減は、該モノクローナル抗体が該腎臓疾患の治療に有効であることを示すものである。

なお、前記と同様にして下記の対照実験を行った。

（1）上述の UUO（尿管結紮処置）を施したマウスにリン酸緩衝液のみ（いずれの抗体も含まない）を前記と同様にして腹腔内投与した。

（2）開腹のみ行い UUO を施さずに開腹部を縫合した正常マウスの場合。

（3）UUO を施さない正常マウスの場合。

（4）前記抗体の代わりに腎繊維症などの繊維症治療薬として臨床試験中の Pirfenidone（Kidney Int., Vol.54, No.1, p.99-109, 1998）（約 500mg/kg）を餌に混入させて与えた場合（陽性対照試験）。

結果を、図17に示した。

この結果、本発明のモノクローナル抗体が、腎臓疾患並びに組織繊維症に対して有意な抑制及び治療効果を有していることが示された。

また驚くべきことに、本発明のモノクローナル抗体による有効性は、極めて高用量で投与した陽性対照薬（例えば、50kg の患者への4回投与の場合に換算すると約 100g）の有効性と同様であった。

<4-16> 抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体の遺伝子配列及びアミノ酸配列の決定及び解析

前記実施例で作製された種々のヒト CTGF に対するヒトモノクローナル抗体を構成する重鎖 (Heavy Chain) の可変領域をコードする cDNA 配列、並びに軽鎖 (Light Chain) の可変領域及び定常領域をコードする cDNA 配列を下記のようにして決定するとともに、該遺伝子の構造的特徴を解析した。本実施例における配列解析の手順を図 18 に模式的に示した。

前記実施例で作製したヒト CTGF に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (クローン : A29、C26、C59、C114 及び M295 ; 各々約 5×10^7 細胞) を培養後、遠心分離し、沈殿物を回収し、後述する PolyA⁺RNA の抽出時まで -80°C で保存した。

各々のハイブリドーマからの PolyA⁺RNA の抽出、精製は、市販の FastTrack2.0kit (INVITROGEN 製) を用いて次のようにしてした。前記各々の凍結細胞を、細胞溶解緩衝液 (Lysis Buffer) に溶解し、POLYTRON により細胞を破壊し、可溶化させた。該可溶化物を 45°C でインキュベーションした後、Oligo(dT) cellulose を加え約 1 時間緩やかに振盪した。次いで、Oligo(dT) cellulose を洗浄後、PolyA⁺RNA を Ellution Buffer で溶出させた。溶出した PolyA⁺RNA をエタノール沈殿させ、 $20\mu\text{l}$ の Tris-EDTA 緩衝液に溶解した。得られた PolyA⁺RNA の濃度を、 260nm の波長での吸光度を測定することにより決定した。

得られた PolyA⁺RNA を鋳型とし、市販の Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH 製) を用いた RACE-PCR 法により常法により cDNA を合成した (「遺伝子増幅 PCR 法・基礎と新しい展開」、1992 年第 2 刷、共立出版株式会社発行、p.13-15)。即ち、各々のハイブリドーマから精製した PolyA⁺RNA (1 乃至 $5\mu\text{g}$) を鋳型として、1st strand cDNA 及び 2nd strand cDNA を順次合成した。該 cDNA を、フェノール/クロロホルム/イソアミノアルコール並びにクロロホルムを用いて各々 1 回ずつ抽出に供した。次いで、cDNA をエタノール沈殿させ、アダプター DNA (配列番号 25) に連結させた。得られた DNA 反応物を 1/250 に希釈したものを鋳型とし、合成プライマーを用いて常法により PCR を行い抗体重鎖及び抗体

軽鎖を各々コードする cDNA を調製した。抗体重鎖に係る PCR には、配列番号 26 に記載のプライマーを用いた。抗体軽鎖に係る PCR には、配列番号 27 に記載のプライマーを用いた。

各々の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分画し、DNA を回収した。得られた各々の cDNA の塩基配列の決定を、市販の DyeTerminator Cycle Sequencing FS Kit (PE-Applied Biosystems 製) 及び PRISM377 DNA Sequencer (PE-Applied Biosystems 製) を用いて行った。なお、本配列決定のための Sequencing Primer は、前述の PCR において使用したプライマーを使用した。さらに、得られた配列から適切な Sequencing Primer を作成しさらに反応を実施した。

前記の各々のハイブリドーマが産生するヒト CTGF に対するヒトモノクローナル抗体の重鎖の可変領域をコードする cDNA 配列、軽鎖 (Light Chain) の可変領域をコードする cDNA 配列、並びに該各々の cDNA 配列から演繹されるアミノ酸配列を下記のとおり配列表に示した。

<クローン A29>

(重鎖の可変領域)

DNA 配列 : 配列番号 5 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 57、V 領域 : 塩基番号 58 乃至 363)

アミノ酸配列 : 配列番号 6 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 120 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA 配列 : 配列番号 15 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 60、V 領域 : 塩基番号 61 乃至 365)

アミノ酸配列 : 配列番号 16 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 20、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 120 を含む)

<クローン C26>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 7 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 57、V領域 : 塩基番号 58 乃至 357)

アミノ酸配列 : 配列番号 8 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 118 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 17 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 60、V領域 : 塩基番号 61 乃至 364)

アミノ酸配列 : 配列番号 18 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 20、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 121 を含む)

<クローン C59>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 9 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 57、V領域 : 塩基番号 58 乃至 350)

アミノ酸配列 : 配列番号 10 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 116 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 19 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 66、V領域 : 塩基番号 67 乃至 353)

アミノ酸配列 : 配列番号 20 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 22、可変領域 : アミノ酸番号 23 乃至 117 を含む)

<クローン C114>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 11 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 57、V領域 : 塩基番号 58 乃至 350)

アミノ酸配列 : 配列番号 12 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 116 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 21 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 47 を含む、V領域 : 塩基番号 48 乃至 335)

アミノ酸配列 : 配列番号 22 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 16 を含む、可変領域 : アミノ酸番号 17 乃至 111 を含む)

<クローン M295>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 13 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 58、V領域 : 塩基番号 59 乃至 353)

アミノ酸配列 : 配列番号 14 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領域 : アミノ酸番号 21 乃至 117 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号 23 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 66、V領域 : 塩基番号 67 乃至 356)

アミノ酸配列 : 配列番号 24 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 22、可変領域 : アミノ酸番号 23 乃至 118 を含む)

決定された各々のDNA配列を基に、遺伝子配列解析ソフトウェアを用いて、Tomlinson らにより作成されたヒトイムノグロブリンの可変領域遺伝子のライブラリーV BASE Sequence (Immunol. Today, Vol.16, No.5, p.237-242, 1995) を検索した。

その結果、上記ヒトモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の各々のV領域遺伝子は、各々下記のセグメントから構成されていることが分かった。

<重鎖V領域遺伝子>

クローン A29 : DP-38

クローン C26 : DP-75

クローン C59 : DP-5

クローン C114 : DP-5

クローン M295 : DP-65

<軽鎖V領域遺伝子>

クローン A29 : DPK24

クローン C26 : DPK12

クローン C59 : DPK1

クローン C114 : DPK1

クローン M295 : DPK9

なお、上記ヒトモノクローナル抗体の重鎖をコードする cDNA 配列には、V領域と下流のD領域の間、並びにD領域とさらに下流のJ領域の間にN領域 (N-addition) を有しているものと考えられた。

実施例5 ヒトCTGF及びマウスCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系確立

<5-1> 抗体固定化マイクロプレートの作製

本実施例においてマイクロプレートに固定化するモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常マウス由来のモノクローナル抗体 8-64-6 (国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別されるハイブリドーマに由来する) を用いた。このモノクローナル抗体は、ヒトCTGFに高い反応性を有するとともに、マウスCTGFにも交叉反応性を示す。

モノクローナル抗体 8-64-6 をリン酸緩衝液で希釈し、 $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /ウェルの濃度で、ELISA用96穴マイクロプレート (コーニング (Corning) 社製) の各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートし、モノクローナル抗体 8-64-6 をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに3%のウシ血清アルブミン (BSA; Bovine serum albumin) を含有するリン酸緩衝液 ($200\mu\text{l}$ /ウェル) を加え、室温で2時間インキュベーションすることにより抗体が結合してい

ない部位をブロックした。次いで、プレートを用リン酸緩衝液で3回洗浄した。

<5-2> 標識モノクローナル抗体の作製

本実施例において標識されるモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常マウス由来のモノクローナル抗体 8-86-2 (国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別されるハイブリドーマに由来する) を用いた。このモノクローナル抗体は、ヒト CTGF、マウス CTGF 及びラット CTGF のいずれにも高い反応性を有する。

モノクローナル抗体 8-86-2 (20mg/ml を 1ml) を、0.1M の NaHCO_3 (pH8.2~8.3) 溶液で、透析 (4℃、24時間) した。次いで、NHS-ビオチン (2mg/ml を 100 μ l、ピラス社製) を加え、激しく攪拌した後、室温下で30分インキュベートした。次いで、リン酸緩衝液で透析 (4℃、24時間) した。

<5-3> サンドイッチ ELISA による定量法の確立

本発明で確立されたヒト CTGF 及びマウス CTGF の定量のためのサンドイッチ ELISA 系は以下の通りである。

実施例<5-1>で作製した抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、測定試料 (50 μ l/ウェル) を加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロプレートを、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、各ウェルに、1% BSA、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で希釈した実施例<5-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体 (0.3 μ l/50 μ l/ウェル) を加え、室温下で1時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、0.5M の NaCl と 20mM の HEPES からなる溶液 (BSA (1mg/ml) を含有、pH7.0) で 1000 倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、ギブコ (Gibco BRL) 社製) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、

100mM の NaCl、1mM の $MgCl_2$ 及び 10mM のリン酸緩衝液 (Na 及び K を含有) からなる溶液 (BSA(1mg/ml)) を含有、pH7.0) で希釈した 1% の 4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で 10 分間インキュベートした。

各ウェルに、1M の Na_2CO_3 (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長 460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャン II マイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。測定試料中のヒト CTGF またはマウス CTGF 量は、下記実施例で作成した検量線から求めた。

< 5-4 > 検量線の作成

実施例< 4-8 >で調製したアフィニティー精製した組換えヒト CTGF または組換えマウス CTGF を CTGF 標準物質 (スタンダード) として用い、実施例< 5-3 >で確立したサンドイッチ ELISA を用いて検量線を作成した。結果を図 19 に示す。

ヒト CTGF については、極めて低濃度である 3 ng/ml ~ 1000 ng/ml の濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。マウス CTGF については、30 ng/ml ~ 1000 ng/ml の濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。しかしながら、実施例< 5-3 >で確立したサンドイッチ ELISA 系では、ラット CTGF は定量できなかった。

実施例 6 マウス CTGF 及びラット CTGF の定量のためのサンドイッチ ELISA 系確立

< 6-1 > 抗体固定化マイクロプレートの作製

本実施例においてマイクロプレートに固定化するモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常ラット由来のモノクローナル抗体 13-51-2 を用いた。このモノクローナル抗体は、マウス CTGF に高い反応性を有するとともに、ラ

ットCTGFにも交叉反応性を示す。

モノクローナル抗体 13-51-2 をリン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、 $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /ウェルの濃度で、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (コーニング (Corning) 社製) の各ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートし、モノクローナル抗体 13-51-2 をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに 3% のウシ血清アルブミン (BSA; Bovine serum albumin) を含有するリン酸緩衝液 ($200\mu\text{l}$ /ウェル) を加え、室温で 2 時間インキュベーションすることにより抗体が結合していない部位をブロックした。次いで、プレートをリン酸緩衝液で 3 回洗浄した。

< 6-2 > 標識モノクローナル抗体の作製

実施例< 5-2 >で作製したビオチン標識モノクローナル抗体、即ち、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有するモノクローナル抗体 8-86-2 (国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別されるハイブリドーマに由来する) をビオチンで標識した標識モノクローナル抗体を用いた。

< 6-3 > サンドイッチELISAによる定量法の確立

本発明で確立されたマウスCTGF及びラットCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系は以下の通りである。

実施例< 6-1 >で作製した抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、測定試料 ($50\mu\text{l}$ /ウェル) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。マイクロプレートを、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で 3 回洗浄後、各ウェルに、1% BSA、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で希釈した実施例< 6-2 >で作製したビオチン標識モノクローナル抗体 ($0.3\mu\text{l}/50\mu\text{l}$ /ウェル) を加え、室温下で 1 時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で 3 回洗浄後、0.5M の NaCl と 20mM の HEPES からなる溶液 (BSA ($1\text{mg}/\text{ml}$)) を含有、pH7.0) で 1000 倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -

galactosidase、50 μ l、ギブコ (Gibco BRL) 社製) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20 を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、100mM の NaCl、1mM の $MgCl_2$ 及び 10mM のリン酸緩衝液 (Na 及び K を含有) からなる溶液 (BSA(1mg/ml)) を含有、pH7.0) で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。

各ウェルに、1M の Na_2CO_3 (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長 460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャン II マイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。測定試料中のマウス CTGF またはラット CTGF 量は、下記実施例で作成した検量線から求めた。

< 6-4 > 検量線の作成

実施例< 4-8 >で調製したアフィニティー精製した組換えマウス CTGF または組換えラット CTGF を CTGF 標準物質 (スタンダード) として用い、実施例< 6-3 >で確立したサンドイッチ ELISA を用いて検量線を作成した。結果を図 20 に示す。

マウス CTGF については、極めて低濃度である 1 ng/ml ~ 1000 ng/ml の濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。ラット CTGF については、10 ng/ml ~ 1000 ng/ml の濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。しかしながら、実施例< 6-3 >で確立したサンドイッチ ELISA 系では、ヒト CTGF は定量できなかった。

実施例 7 各種疾患に罹患している患者の血清中の CTGF の定量

実施例< 5-3 >で確立されたサンドイッチ ELISA による定量法を用いて各種患者の血清中の CTGF を定量した。

<7-1>胆道閉鎖症、リウマチ性血管炎、悪性慢性関節リウマチ、乾癬及びアトピー性皮膚炎

本試験で用いたヒト血清は、健常人（33検体）、胆道閉鎖症に罹患し、外科手術を受けた患者の術後サンプル（<第1群>臨床所見は正常な患者（17検体）、<第2群>症状進行中の患者（14検体）、及び<第3群>肝臓移植を必要とする重症患者（8検体））、リウマチ性血管炎に罹患している患者（10検体）、悪性慢性関節リウマチ（Malignant rheumatoid arthritis, MRA）に罹患している患者（17検体）、乾癬に罹患している患者（24検体）、及びアトピー性皮膚炎に罹患している患者（34検体）の各々から採取した血清である。

結果を図21（胆道閉鎖症）及び図22（リウマチ性血管炎、悪性慢性関節リウマチ、乾癬及びアトピー性皮膚炎）に示す。

胆道閉鎖症患者では、CTGFが第2群（症状進行期）で有意な発現することが明らかとなった。また、リウマチ性血管炎、悪性慢性関節リウマチでは、健常人に比べ有意に多くのCTGFを発現していることが明らかとなった。

<7-2> 慢性関節リウマチ及び変形性関節症

本試験で用いたヒト血清は、慢性関節リウマチ（Rheumatoid arthritis, RA）に罹患している患者（36名）及び変形性関節症（Osteoarthritis, OA）に罹患している患者（19名）の各々から採取した関節液である。

結果を図23に示す。

慢性関節リウマチ患者の関節液中のCTGF濃度は、変形性関節症のそれに比べ有意に高いことが明らかとなった。

この結果から、本発明のアッセイ系は、健常人のみならず種々の疾患患者でのCTGFの発現状態を高感度で定量することができ、その病状の進行程度を的確に把握するための臨床診断薬としての有用性を有していると言えることができる。

実施例8 抗体フラグメント $F(ab')_2$ 及びFabの調製

前述のようにして調製した各種モノクローナル抗体の抗体フラグメント

F(ab')₂及びFabは、下記のようにして調製する。

モノクローナル抗体 (5mg/ml) を、20mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.5) に加え、37℃で30分間インキュベートする。次いで、不溶化ペプシン (1ml、ピアス社製) を加え、ローテーターで回転させながら37℃で12時間インキュベートする。反応液を回収し、遠心分離 (3000rpm、10分間) し、上清を回収する。

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを、プロテインAカラムキット (アマシャム社製) のプロトコールに従って以下のようにして行う。遠心沈殿物に結合緩衝液を加え、遠心分離 (3000rpm、10分間) し、上清を回収する。2回の遠心分離で回収した上清を集め、等量の結合緩衝液を加え、さらに1Nの水酸化ナトリウムを加えてpH8.9に調整する。該混合溶液を、該結合緩衝液で平衡化した該プロテインAカラムに添加した後、該結合緩衝液 (5ml) で2回洗浄し、溶出分画を回収する。得られた溶出分画を、5mM のリン酸緩衝液 (2L、pH6.8) で透析 (4℃、24時間) する。

さらなる精製のためヒドロキシアパタイトカラム (バイオラッド社製) を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行う。透析により得られる溶液を、該ヒドロキシアパタイトカラムに添加し、5mM のリン酸緩衝液を15分間流した後、5mM~0.4M のリン酸緩衝液で直線濃度勾配溶出させる。溶出液をフラクションコレクターで分取し、280nmでの吸光度を測定し、F(ab')₂を含む分画を回収する。得られた分画をリン酸緩衝液 (2L) で透析 (4℃、24時間) し、モノクローナル抗体の精製F(ab')₂を得る。

実施例9 ヒトCTGF発現トランスジェニックマウスの作製

実施例2で取得したヒトCTGFをコードするcDNAを、ニワトリβアクチンプロモーターを有する発現ベクターpCAGGS (Gene, Vol.108, p.193-200, 1991) に、DNA末端平滑化キット (タカラ社製) を用いて挿入し、プラスミドphCTGFを得た。エレクトロポレーション法により、phCTGFでヒト腎臓由来線維芽

細胞株 293-T (ATCC CRL1573) を形質転換した。実施例 5 で確立したサンドイッチ E L I S A により、得られた形質転換細胞が培養上清中にヒト C T G F を発現、分泌していることを確認した。

トランスジェニックマウス作製のために、phCTGF を制限酵素処理して直鎖状にした。

仮親マウスには、白色 I C R マウス (雌、日本エスエルシー社製) と精管結紮した白色 I C R マウス (雄、日本エスエルシー社製) とを交配して得られたブラグ (または腔栓) を有する雌 I C R マウスを用いた。また、ヒト C T G F 遺伝子を導入するための受精卵を得るための採卵用マウスは、PEAMEX (5 ユニット、三共ゾーキ社製) 及びプレグニール (5 ユニット、オルガノン社製) を投与することにより過剰排卵させた BDF-1 マウス (雌、日本エスエルシー社製) を BDF-1 マウス (雄、日本エスエルシー社製) と交配させて作製した。交配後、BDF-1 マウス (雌) から卵管部を摘出し、ヒアルロニダーゼ処理により受精卵のみを得、培地中で保存した。

受精卵へのヒト C T G F 遺伝子の導入は、顕微鏡下でマニピュレーターを用いて常法により行った。受精卵を保定針で固定し、37℃条件下、トリス E D T A 緩衝液で希釈したヒト C T G F の前記直鎖状遺伝子を含有する溶液を、DNA 導入針を用いて受精卵の雄性前核内に注入した。

遺伝子導入後、正常な状態を保持する受精卵のみを選別し、仮親マウス (白色 I C R マウス) の卵巣内にある卵管采に、ヒト C T G F 遺伝子導入受精卵を挿入した。

仮親から生まれた子マウス (キメラマウス) の尾を切取りゲノム遺伝子を回収し、P C R によりマウスゲノム内にヒト C T G F 遺伝子が導入されていることを確認した。また、実施例 5 で確立したサンドイッチ E L I S A により、該マウスの血清中にヒト C T G F が発現、分泌されていることを確認した。次いで、このキメラマウスを正常マウスと交配させることによりヒト C T G F 高発現ヘテロト

ランスジェニックマウスを作製した。該ヘテロマウス同士を掛け合わせることに
よりホモマウスを作製した。

実施例 1 1 ラット CTGF の調製

< 1 1 - 1 > cDNA のクローニング

(1) ラット cDNA ライブラリー及びプローブの作製

ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570、約 1×10^6 /ml) を遠心
(2,000×g、5 分間、4℃) して、沈殿した細胞を ISOGEN (ニッポンジーン社製)
を用いて懸濁させた後、クロロホルムで振とう抽出して上清を回収した。得られ
た上清にイソプロパノールを添加して室温で 10 分間放置した後、遠心 (12,000
×g、10 分間、4℃) し、RNA を沈殿させた。沈殿した RNA をエタノールで洗浄し
た後、TE 緩衝液に溶解した。得られた全 RNA から、mRNA Purification Kit
(Pharmacia 社製) を用いて poly(A)⁺RNA を精製した。

poly(A)⁺RNA (5 μg) を鋳型とし、Superscript 1 system for cDNA Synthesis
Kit (GIBCO-BRL 社製) を用いて cDNA を合成した。スクリーニングの効率を上げ
るため、NotI 切断部位を有する oligo dT プライマー (GIBCO-BRL 社製) を用いた。
SalI アダプター付加した後 NotI 消化を行い、単一方向性を有する cDNA を得た。
さらに cDNA サイズ分画カラム (cDNA size fractionation column、GIBCO-BRL
社製) を用いてサイズ分画を行った。

実施例 2 で取得したヒト及びマウス CTGF をコードする cDNA 塩基配列を比較し
ヒト・マウス間で相同性の高い領域を利用して 5' プライマー (配列番号 3) 及び
3' プライマー (配列番号 4) を設計し、合成した。

上記のようにして作製した cDNA ライブラリーを鋳型とし、前記両プライマー及
び Ex Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いて PCR (Polymerase Chain
Reaction) を行った。反応は、DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus 社
製) を用いて、プライマー終濃度が 0.4 μM 及び Mg²⁺濃度が 1.5mM の条件下で、94℃
で 1 分、55℃で 1 分及び 72℃で 1 分の反応を 1 サイクルとして合計 35 サイクル

行った。増幅された DNA を、アガロースゲル電気泳動した後、QUIAEX DNA 抽出キット (QUIAEX DNA Extraction Kit、QUIAGEN 社製) を用いて精製した。

回収した DNA 断片を TA クローニングキット (Invitrogen 社製) を用いてベクター pCRII (Invitrogen 社製) に連結した後、オートリードシーケンシングキット (Auto Read Sequencing Kit、Pharmacia 社製) 及び A.L.F. DNA シーケンサー (Pharmacia 社製) を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。得られた cDNA 断片の塩基配列を、実施例 2 及び実施例 3 で各々取得したヒト及びマウスの CTGF の塩基配列と比較した結果、当該 cDNA 断片はヒト及びマウスの CTGF のラットホモログ (ラット CTGF) をコードする領域を含んでいることが確認された。

該 cDNA 断片 (約 0.8kb) を、ECL ランダムプライムラベリングキット (ECL random prime labelling system、Amersham 社製) を用いて FITC 標識し、ブランクハイブリダイゼーション用プローブとして使用した。

(2) cDNA ライブラリーのベクターへの組み込み及びパッケージング

前記 (1) で得られた cDNA 断片を、ベクター ZipLox NotI-SalI arm (GIBCO-BRL 社製) に連結した。連結反応には DNA ライゲーションキット (DNA ligation Kit、宝酒造社製) を用いた。次いで、GIGA PACK II GOLD (Stratagene 社製) を用いてインビトロパッケージングした後、得られたファージ粒子を用いて、大腸菌 Y1090 (GIBCO-BRL 社製) を宿主として、組み換えファージを含有するブランクからなる cDNA ライブラリーを作製した。

(3) cDNA ライブラリーのスクリーニング

ラビッドハイブリダイゼーション緩衝液 (Rapid hybridization buffer、Amersham 社製) を用いたブランクハイブリダイゼーション法 (マニアティス (Maniatis) ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従い、前記 (2) で調製した cDNA ライブラリーのスクリーニングを下記のようにして行った。

前記(2)で得られたライブラリー(1×10^4 個ブランク)を寒天プレートに蒔き、ハイボンド-N ナイロンメンブラン(Hybond-N nylon membrane、Amersham 社製)を用いてレプリカを作製した。このレプリカと前記(1)で作製した FITC 標識プローブを用いて、ラビッドハイブリダイゼーション緩衝液(Rapid hybridization buffer、Amersham 社製)中でブランクハイブリダイゼーションを行った。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、13個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルブランクで単離した後、GIBCO-BRL 社のマニュアルに従ってインビボエクサイジョン(in vivo Excision)に供し、13クローンをプラスミド DNA として回収した。

(4) 塩基配列決定

13個のクローンについてオートリードシーケンシングキット(Auto Read Sequencing Kit、Pharmacia 社製)と A.L.F.DNA シーケンサー(Pharmacia 社製)を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。13個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。ヒト及びマウス CTGF の cDNA 配列と比較した結果、得られたクローン r311 にはラット CTGF の全長をコードする cDNA 領域が含まれることが確認された。なお、得られらラット CTGF の全長 cDNA 配列(5' 及び 3' 末端塩基配列を含む)を配列番号 1 に、またその配列から演繹されるアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

<11-2> 組換えラット CTGF の調製

実施例<11-1>で取得したラット CTGF をコードする cDNA を含むクローン r311 を Sall-DraI で消化して、ラット CTGF をコードする cDNA を含む DNA 断片を切りだした。該 DNA 断片をプラスミド p cDNA3.1(-) (Invitrogen 社製)に挿入し発現ベクターを作成した。エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト上皮様細胞株 Hela (ATCC CCL-2) を形質転換した。形質転換細胞を、Geneticin(0.8mg/ml; GIBCO-BRL 社製)及び 10%ウシ胎児血清(fetal calf serum)を含有する RPMI1640 培地中で約 2 週間培養することにより、

Geneticin 耐性形質転換細胞クローンを選別した。選別された形質転換細胞を、無血清培地 ASF104 (味の素社製) 中培養し、組換えラット C T G F を発現させた。ラット C T G F の発現を、前記実施例 4 で調製したラット C T G F に交叉反応性を有するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養培養上清を回収し、硫化アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3M の NaCl/PBS で洗浄した後、0.5M の NaCl/PBS で溶出し、部分精製ラット C T G F 画分を得た。

産業上の利用可能性

本発明は、未だ提供されていない、ヒト、マウス、ラット及びウサギ等の種々の哺乳動物の C T G F に対して、抗原特異性、抗原親和性、中和活性、及び交叉反応性等の性質の点で、異なる特性を有する種々の哺乳動物由来の種々のモノクローナル抗体を提供するものである。特に、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスを免疫動物として用いることにより、ヒト C T G F に対する種々のヒトモノクローナル抗体を世界に先んじて初めて提供するものである。

本発明のモノクローナル抗体の内、ヒト C T G F に対するモノクローナル抗体及びその医薬組成物は、その発症が C T G F に起因することが予測される可能性を有するような種々の疾患症状、例えば、腎疾患 (腎繊維症、腎炎、腎不全など)、肺疾患 (例えば、肺線維症、肺炎など)、肝臓疾患 (例えば、肝臓組織繊維症、肝硬変、肝炎など)、皮膚疾患 (例えば、創傷、強皮症、乾癬、ケロイドなど)、関節炎 (例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症など)、血管疾患 (例えば、リウマチ性血管炎など)、各種癌で併発する組織繊維症、及び動脈硬化症 (特に、併発する組織繊維症) などの発症及び/または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

特に、ヒトモノクローナル抗体及びその医薬組成物は、マウス由来の抗体等の

非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点(副作用)であったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

さらに、本発明の種々のモノクローナル抗体を用いることにより、種々哺乳動物(ヒト、マウス、ラット及びウサギ等)の体液(血清等)中のCTGFを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で定量できる種々のイムノアッセイ系(方法及びキット)を提供することができる。また、該モノクローナル抗体を不溶性担体の固定化したアフィニティーカラムを作製することにより、種々の哺乳動物のCTGFを高純度で容易に精製することが可能となる。

また、本発明のヒトCTGFを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物(トランスジェニックマウス等)は、ヒトCTGFの生理学的機能を解明するためのモデル動物として有用であるだけでなく、ヒトCTGFの機能を制御(阻害、抑制、活性化、刺激など)する可能性を種々の医薬(低分子化合物、抗体、アンチセンス、ヒトCTGF以外のポリペプチドなど)をスクリーニングするためのツールといして極めて有用である。即ち、そのような薬剤を該トランスジェニック非ヒト哺乳動物に投与し、該動物中でのヒトCTGFの発現の程度を、本発明のアッセイ系(サンドイッチELISAなど)を用いて定量することにより、投与された薬剤のヒトCTGFに対する効果を評価することが可能である。

請求の範囲

1. 下記の (a) 乃至 (g) のいずれかに記載の性質を有することを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒト、マウス及びラットの結合組織増殖因子 (CTGF) のいずれにも反応性を有する；

(b) ヒト及びマウスの CTGF のいずれにも反応性を有し、且つラットの CTGF に反応性を有しない；

(c) マウス及びラットの CTGF のいずれにも反応性を有し、且つヒトの CTGF に反応性を有しない；

(d) ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とヒトの CTGF との結合、または該細胞株 293-T とマウスの CTGF との結合を阻害する；

(e) ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトの CTGF との結合を阻害する；

(f) ヒトの CTGF またはマウスの CTGF の刺激によるラット腎臓由来線維芽 NRK-49F (ATCC CRL-1570) の細胞増殖を阻害する；または

(g) ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

2. モノクローナル抗体が、下記の (a) 乃至 (c) のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒトの CTGF またはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットの CTGF のいずれにも反応性を有する；

(b) マウスの CTGF またはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットの CTGF の

いずれにも反応性を有する；または

(c) マウスのCTGFまたはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する。

3. モノクローナル抗体が、下記の(a)乃至(c)のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒトのCTGFまたはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(b) マウスのCTGFまたはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とマウスのCTGFとの結合を阻害する；または

(c) マウスのCTGFまたはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とマウスのCTGFとの結合を阻害する

4. 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

5. 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

6. 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

7. 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

8. ヒト、マウス、またはラットの CTGF のいずれかに反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部。

9. ヒトモノクローナル抗体が、ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

10. 下記の (a) 乃至 (d) のいずれかに記載の性質を有するヒトの CTGF に反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL1573) とヒトの CTGF との結合を阻害する；

(b) ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトの CTGF との結合を阻害する；

(c) ヒトの CTGF またはマウスの CTGF の刺激によるラット腎臓由来線維芽 NRK-49F (ATCC CRL-1570) の細胞増殖を阻害する；または

(d) ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

11. ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 乃至請求項 10 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはそ

の一部。

12. ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFを、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項11に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

13. トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする請求項8乃至請求項12のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

14. 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DP-5、DP-38、DP-65及びDP-75からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする請求項8乃至請求項13のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

15. 該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DPK1、DPK9、DPK12及びDPK24からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする請求項8乃至請求項13のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

16. 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DP-5、DP-38、DP-65及びDP-75からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来し、且つ該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DPK1、DPK9、DPK12及びDPK24からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする請求項8乃至請求項15のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

17. 該ヒトモノクローナルの重鎖可変領域が、下記(a)乃至(j)のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする請求項9に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号21乃至120番

目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 118 番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 118 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

18. 該ヒトモノクローナルの軽鎖可変領域が、下記 (a) 乃至 (j) のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする請求項 9 に記載の

ヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 117 番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 17 乃至 111 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 17 乃至 111 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 118 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 118 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

19. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6535で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

20. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6535で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

21. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6598で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

22. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6598で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

23. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6599で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

24. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6599で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

25. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

26. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

27. ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部であって、該モノクローナル抗体が、該モノクローナル抗体をヒトのCTGFに反

応性を有する請求項 17 若しくは請求項 18 に記載のいずれかのモノクローナル抗体とヒトの C T G F からなる抗原抗体複合体に反応させた時、該抗原抗体複合体に反応性を有しないことを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部。

28. 該モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 27 に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

29. ラットの C T G F に反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部。

30. 可変領域が請求項 2 乃至請求項 7、請求項 27 または請求項 29 のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の可変領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトの C T G F に反応性を有する組換えキメラモノクローナル抗体。

31. 超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が請求項 2 乃至請求項 7、請求項 27 または請求項 29 のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の相補性決定領域であり、超可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の枠組領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトの C T G F に反応性を有する組換えヒト型モノクローナル抗体。

32. 請求項 1 乃至請求項 29 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する細胞。

33. 請求項 30 または請求項 31 に記載の組換えモノクローナル抗体を産生する細胞。

34. 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を哺乳動物由来の B 細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項 32 に記載の細胞。

35. 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードする DNA 若しくはその軽鎖をコードする DNA のいずれか一方の DNA、または両方の DNA が細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項 32 または請求項 33 に記載の細胞。

36. 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。
37. 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。
38. 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6599 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。
39. 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6600 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。
40. 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。
41. 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。
42. 請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体が固定化されていることを特徴とする抗体固定化不溶性担体。
43. 不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする請求項 42 に記載の抗体固定化不溶性担体。
44. 不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはアフィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする請求項 42 に記載の抗体固定化不溶性担体。
45. 請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識抗体。
46. 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする請求項 45 に記載の標識抗体。
47. 請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、請求

項 4 2 若しくは請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項 4 5 若しくは請求項 4 6 に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか 1 つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体または標識抗体を含んでなることを特徴とする哺乳動物の C T G F の検出または定量に用いられるキット。

4 8. 請求項 4 2 若しくは請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項 4 5 若しくは請求項 4 6 に記載の標識抗体を含んでなることを特徴とする請求項 4 7 に記載の哺乳動物の C T G F の検出または定量に用いられるキット。

4 9. 請求項 1 乃至請求項 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、請求項 4 2 若しくは請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項 4 5 若しくは請求項 4 6 に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか 1 つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体、または標識抗体を用いることを特徴とするイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する方法。

5 0. 少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 4 9 に記載の方法：

(a) 請求項 4 2 または請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物の C T G F との結合により形成される抗原抗体複合体に、請求項 4 5 または請求項 4 6 に記載の標識抗体を反応せしめる工程。

5 1. 少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 4 9 に記載の方法：

(a) 請求項 4 5 または請求項 4 6 に記載の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物の C T G F との結合により形成される抗原抗体複合体に、請求項 4 2 または請求項 4 3 に記載の抗体固定化不

溶性担体を反応せしめる工程。

52. 少なくとも下記 (a) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 請求項 42 若しくは請求項 43 に記載の抗体固定化不溶性担体、請求項 45 若しくは請求項 46 に記載の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

53. 少なくとも下記 (a) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 請求項 42 または請求項 43 に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の C T G F の標準物質を反応せしめる工程。

54. 少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の C T G F の標準物質との混合物に、請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物の C T G F 若しくは該標識された哺乳動物の C T G F の標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

55. 少なくとも下記 (a) 乃至 (c) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 試料に、請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

(b) (a) の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の C T G F の標準物質を反応せしめる工程；及び

(c) 該試料中に含まれる哺乳動物の C T G F 若しくは該標識された哺乳動物の C T G F の標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

56. 請求項 42 または請求項 44 に記載の抗体固定化不溶性担体を含んでなる哺乳動物の C T G F の分離または精製に用いられるキット。

57. 請求項 42 または請求項 44 に記載の抗体固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする哺乳動物の C T G F を分離または精製する方法。

58. アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである請求項 57 に記載の哺乳動物の C T G F の精製方法。

59. ヒトの C T G F をコードする DNA が、内在性遺伝子座に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

60. 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するラットの C T G F。

61. 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を有するラットの C T G F をコードする DNA。

62. DNA が、配列番号 1 に記載される塩基配列中の塩基番号 213 乃至 1256 迄の塩基配列を含むことを特徴とする請求項 61 に記載の DNA。

63. 請求項 2 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

64. 請求項 9 乃至請求項 18 または請求項 28 のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体とを含ん

でなる医薬組成物。

65. 請求項14乃至請求項18または請求項28のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部を含んでなる医薬組成物。

66. 該医薬組成物が、CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする請求項63乃至請求項65のいずれかに記載の医薬組成物。

67. 該医薬組成物が、CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を伴う疾患を治療または予防するための請求項63乃至請求項65のいずれかに記載の医薬組成物。

68. 該細胞の増殖が、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髄、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管からなる群から選ばれる組織における細胞の増殖であることを特徴とする請求項66または請求項67に記載の医薬組成物。

69. 該組織が、肺、肝臓、腎臓、または皮膚であることを特徴とする請求項68に記載の医薬組成物。

70. 該組織が、腎臓であることを特徴とする請求項69に記載の医薬組成物。

71. 該疾患が、さらに組織の繊維化を伴う疾患であることを特徴とする請求項67に記載の医薬組成物。

72. 該組織の繊維化が、肺、肝臓、腎臓または皮膚における繊維化であることを特徴とする請求項71に記載の医薬組成物。

73. 該組織の繊維化が、腎臓における繊維化であることを特徴とする請求項72に記載の医薬組成物。

74. CTGF阻害剤またはCTGF産生阻害剤、並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における疾患を治療または予防するための医薬組成物。

75. 該阻害剤が、CTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であること

を特徴とする請求項 7 4 に記載の医薬組成物。

7 6. 該阻害剤が、請求項 9 乃至請求項 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 4 に記載の医薬組成物。

7 7. 該阻害剤が、請求項 1 4 乃至請求項 1 8 または請求項 2 8 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 6 に記載の医薬組成物。

7 8. 該疾患が、組織の繊維化と伴う疾患であることを特徴とする請求項 7 4 乃至請求項 7 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

7 9. C T G F の刺激により増殖する能力を有する細胞の C T G F の刺激による増殖を抑制する能力を有する物質、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における該細胞の増殖を抑制するための医薬組成物。

8 0. 該物質が、C T G F に反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

8 1. 該阻害剤が、請求項 9 乃至請求項 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

8 2. 該阻害剤が、請求項 1 4 乃至請求項 1 8 または請求項 2 8 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 1 に記載の医薬組成物。

1/25

図 1

クローン名	被免疫動物	抗原	アイソタイプ	交叉反応性			MHL ウサギの 動脈硬化巣組織 への反応性	293細胞の 結合阻害活性
				ヒト	マウス	ラット		
A4.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	O	O
A11.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OXX	O	O
A15.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OXX	XXX		O
A29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OXX	XXX	O	O
B13.7	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OXX	ΔXX		X
B22.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO		X
B29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	X	X
B35.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	X	O
C2.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OXX	OXX	ΔXX		X
C26.11	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	O	O
C59.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO		X
C114.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OXX	OXX	O	O
8-64-6	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OXX	OXX		O
8-86-2	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO	X	O
8-97-3	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO		X
8-149-3	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OXX	OXX	X	O
15-38-1	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO		
13-51-2	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO	O	X
17-132	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OXX		O
23-86	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
24-53	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OOO		X
24-67	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OOO		X
25-91	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO		X
25-101	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	ΔXX		X
25-256	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
25-338	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO		X
25-410	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
25-463	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
2-228-1	正常ハムスター	マウス CTGF		OOO	OOO	OOO		O

THIS PAGE IS BLANK (ISPTO)

2 / 25

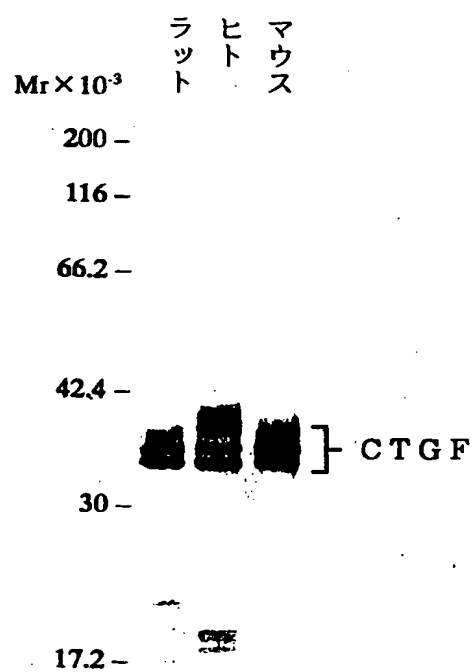
図 2

クローン名	被免疫動物	抗原	7/17/17 ^a	交叉反応性			エピソード マッピング	NRK 細胞の 結合阻害活性	NRK 細胞の 増殖阻害活性
				ヒト CTGF	マウス CTGF	ラット CTGF			
A4.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OOX	A	X	O
A11.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOO	OOΔ	OΔX	(B)		
A15.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOX	XXX	B		O
A29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOO	OOO	OΔX	B	X	O
B13.7	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOX	OOX	B		O
B22.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OOΔ	-	X	O
B29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OOX	-		O
B35.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOX	OOX	B/C	O	O
C26.11	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOX	OOX	B/(C)		O
C59.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOX	OOX	OΔX	(D)	O	O
C114.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOX	OOX	OΔX	D	O	O
M32.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OΔX	ΔXX	A-/B/C		O
M33.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OOΔ	A-/B		O
M84.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OΔX	ΔXX	A-/B/C	X	O
M107.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OΔX	B		O
M122	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				D		O
M124.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OOΔ	B		O
M194.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOΔ	OΔX	A-/B	X	O
M244	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				B		O
M255	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				D		O
M268.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOX	OOΔ	OOX	B		O
M288.5	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOX	OΔX	OOX	A-/B		O
M291.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOX	OΔX	OOX	D		O
M295.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOO	OOO	OOΔ	B	X	O
M315	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				B/C	O	O
M320.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				B	X	O
N45.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOX	OΔX	A-/B	X	O
N50.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOX	OOX	OΔX	A-/B		O
N60.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	OOΔ	OOX	OΔX	B/C	X	O

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 25

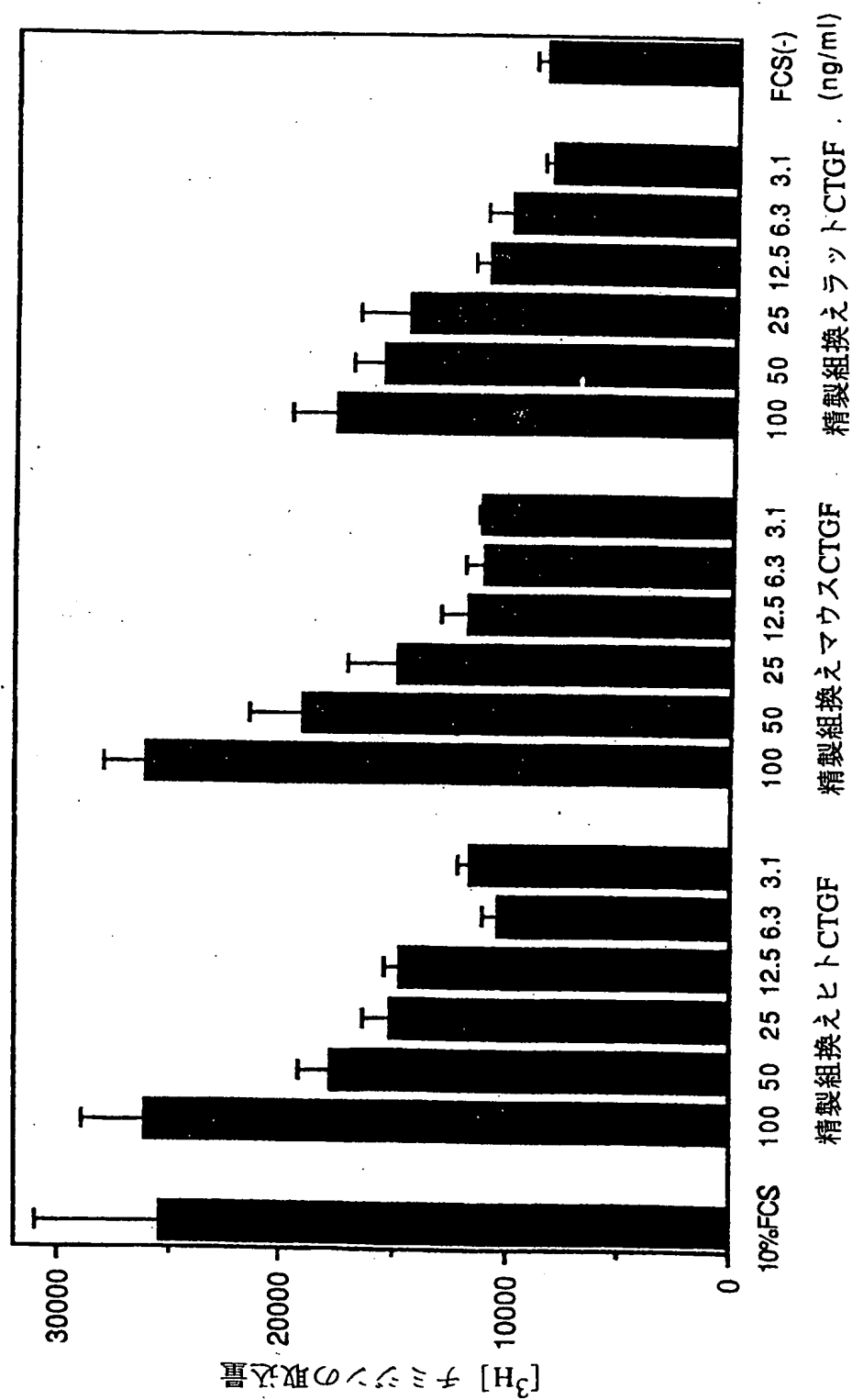
図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 25

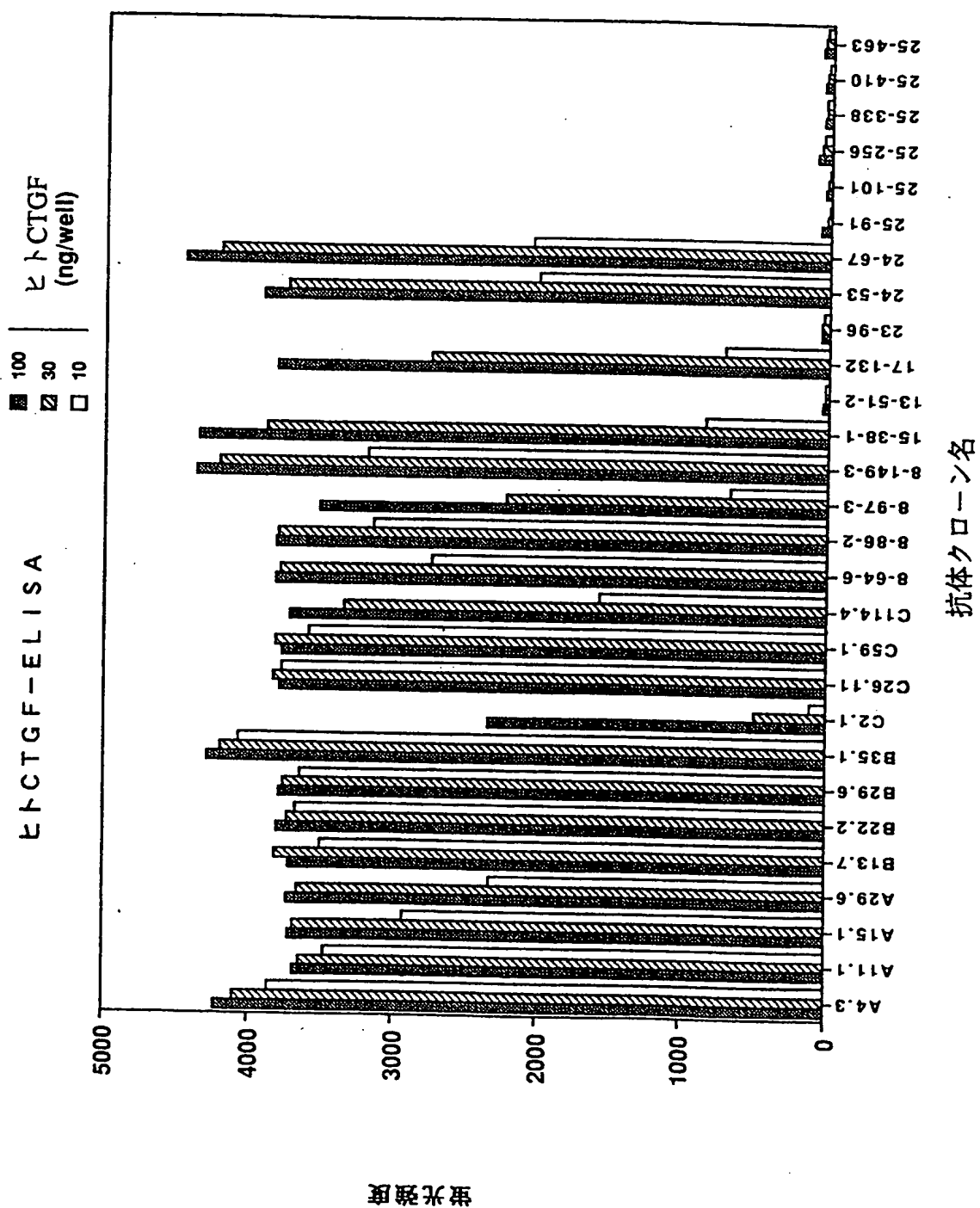
図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 25

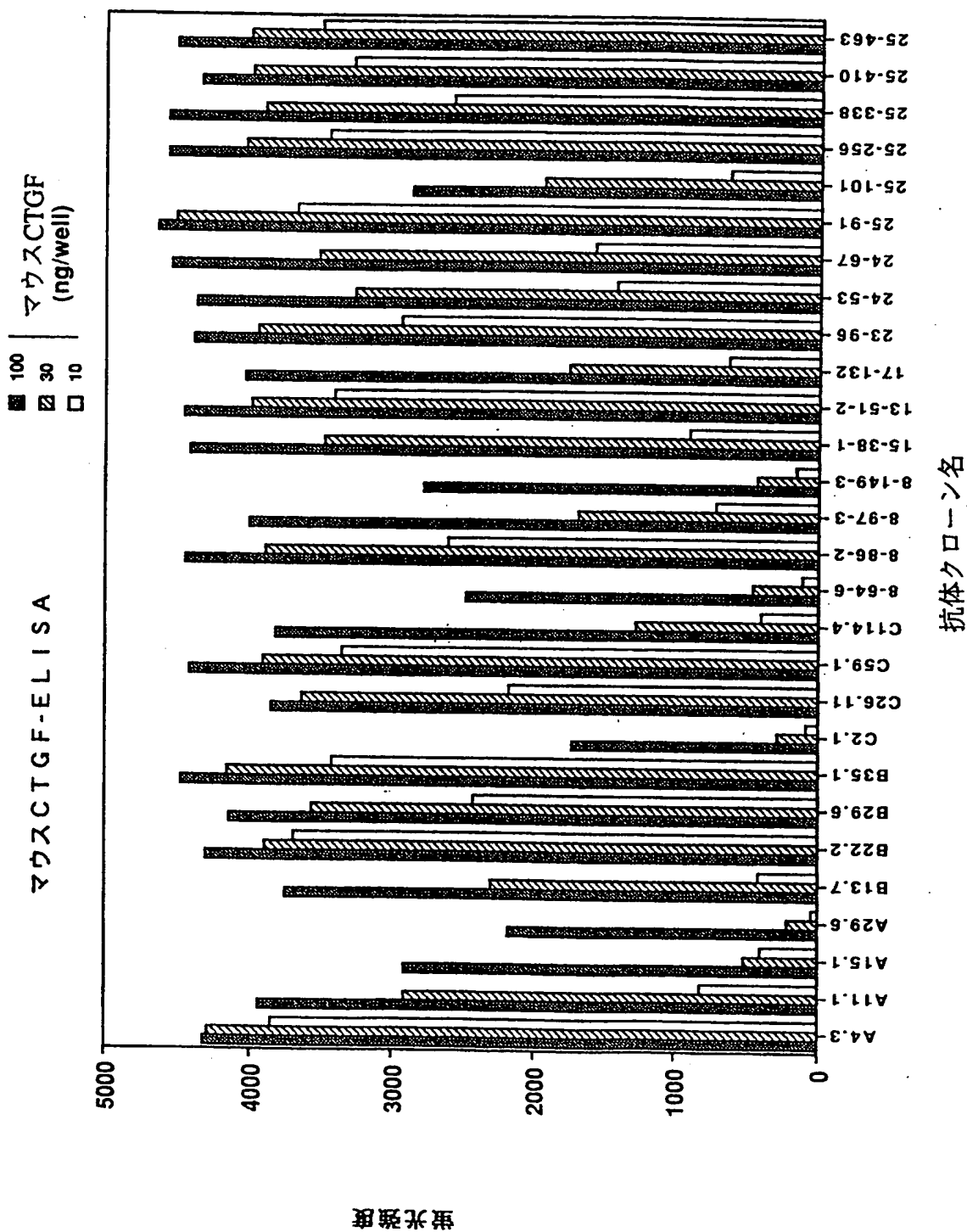
図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 25

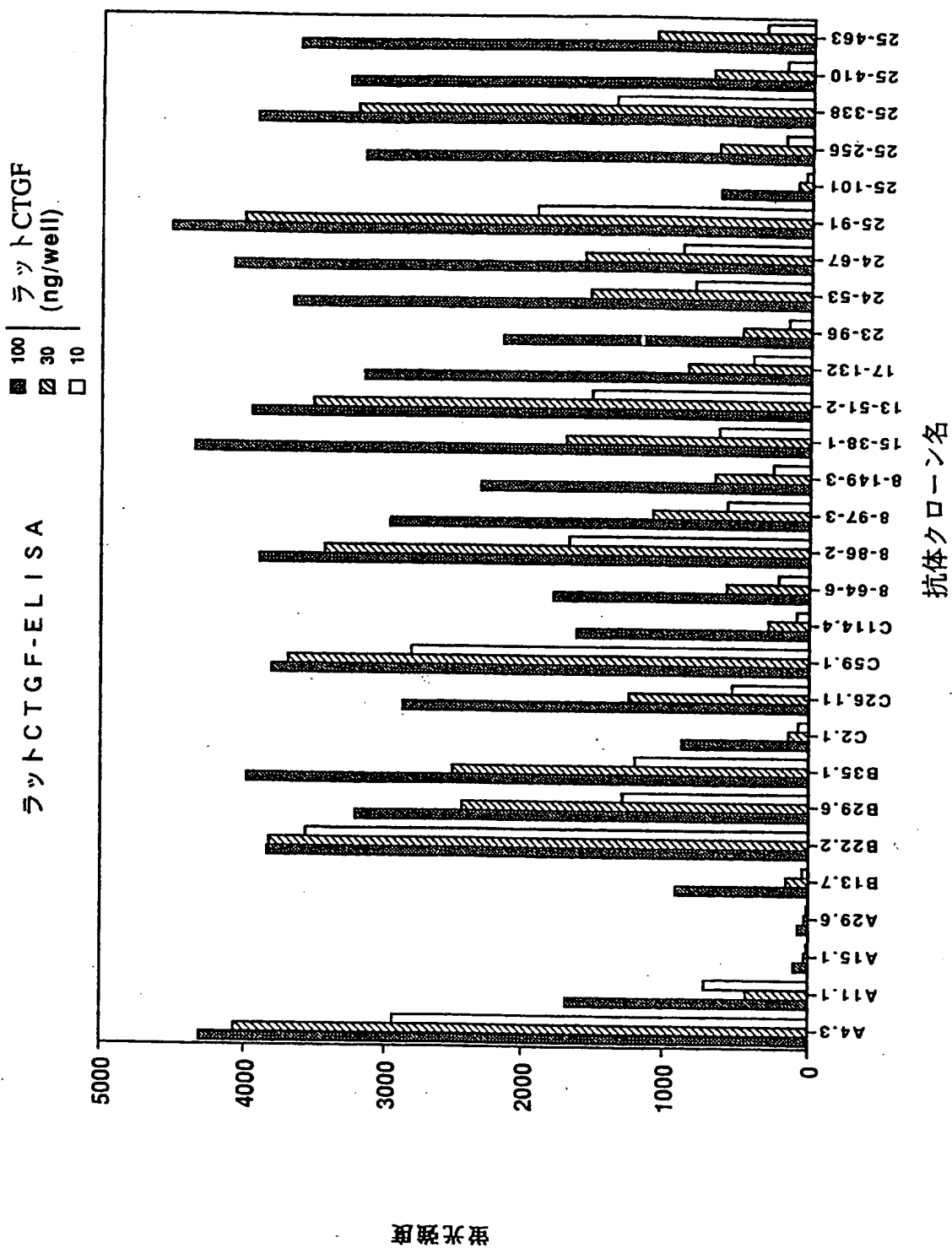
図 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 25

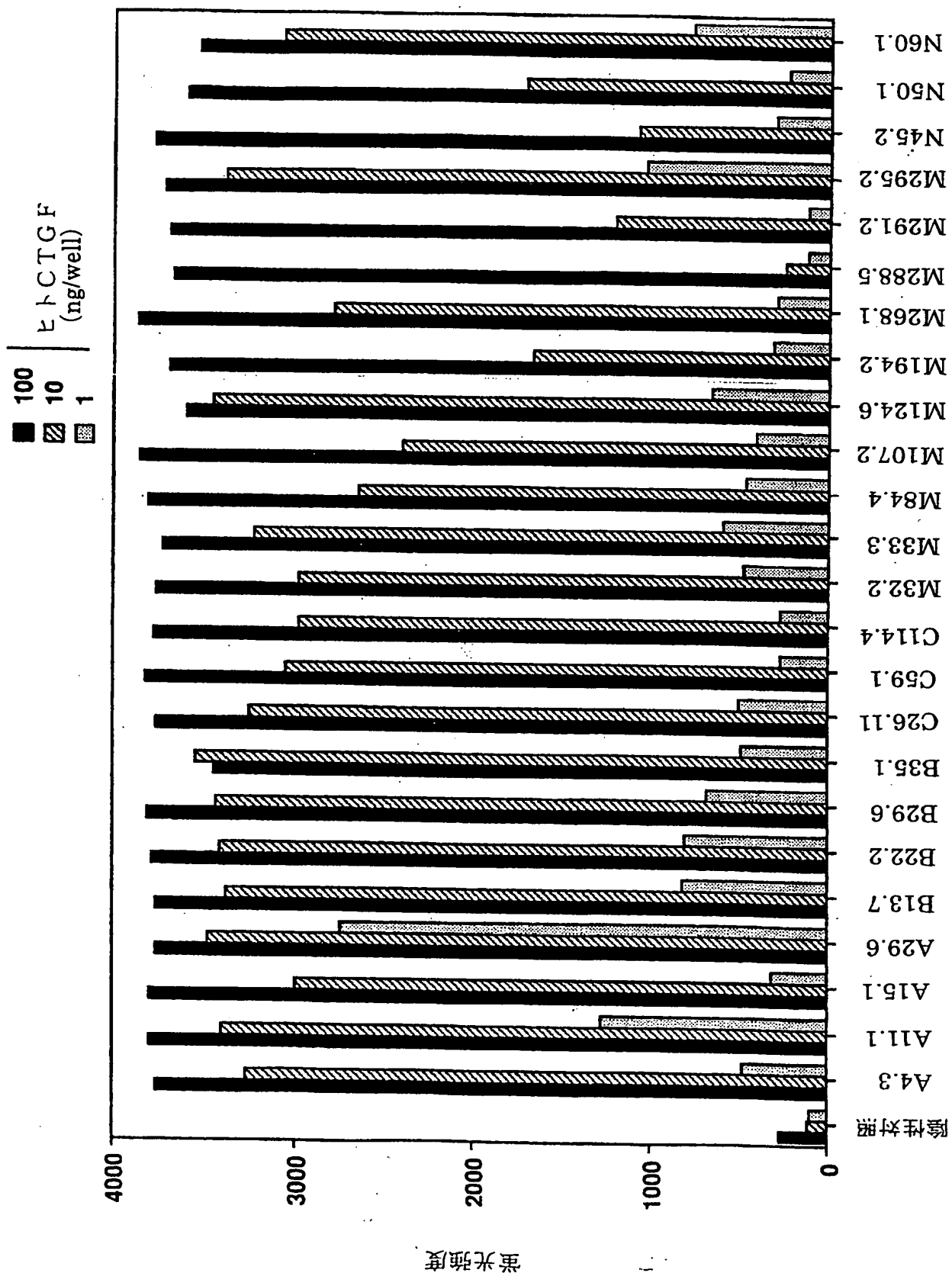
図 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 25

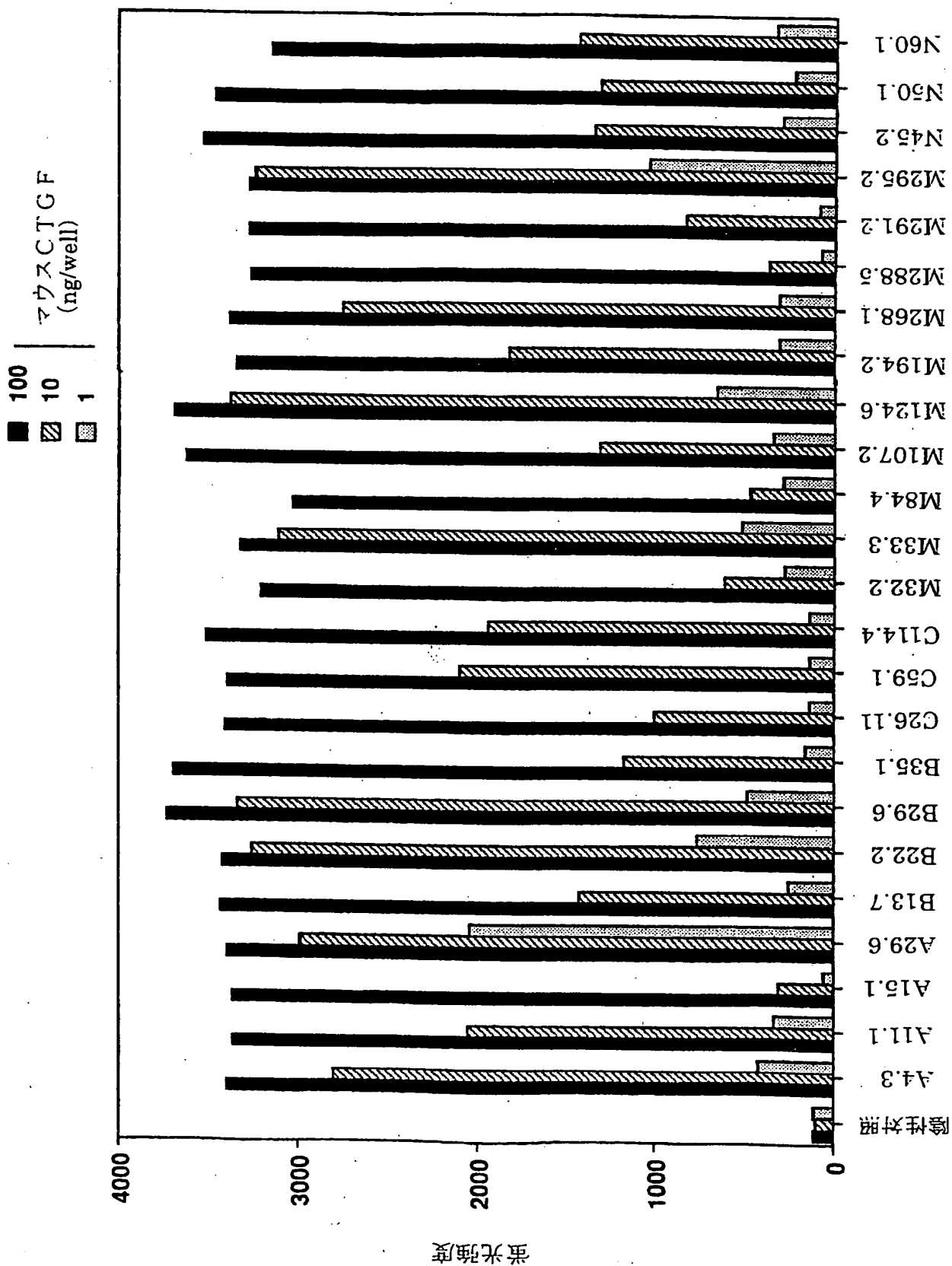
8



THIS PAGE BLANK (USPRO)

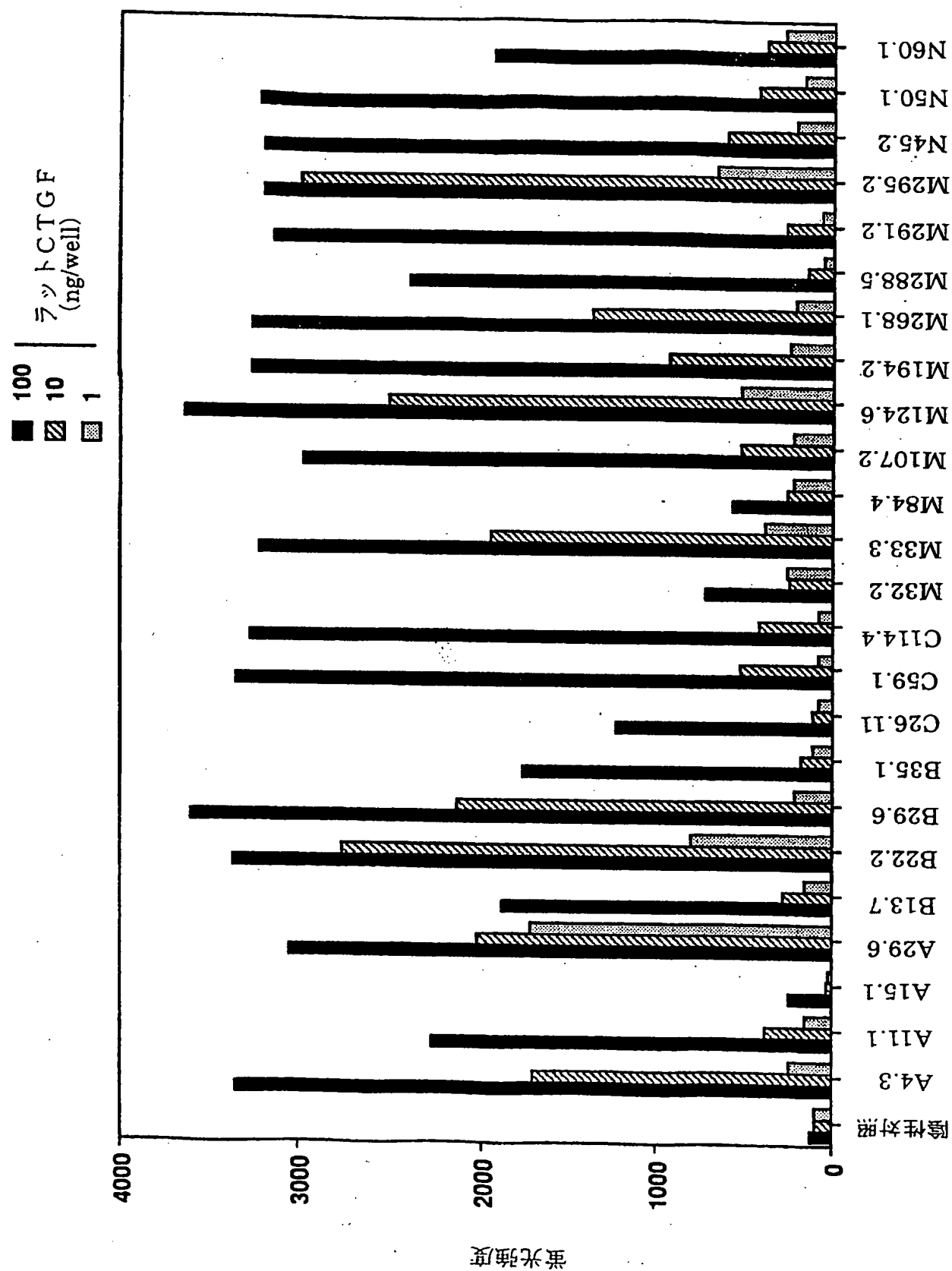
9 / 25

9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

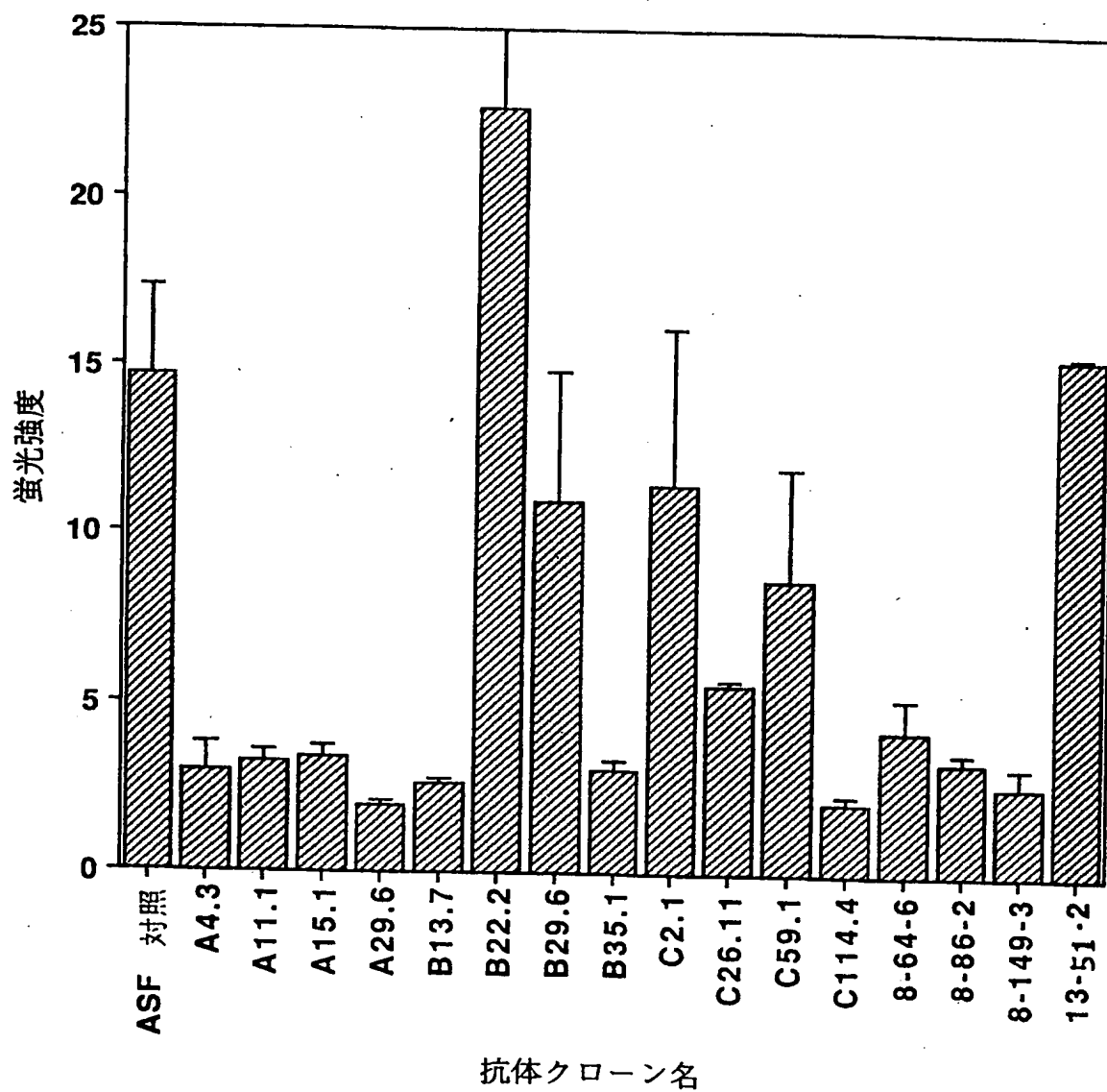
図 10



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/25

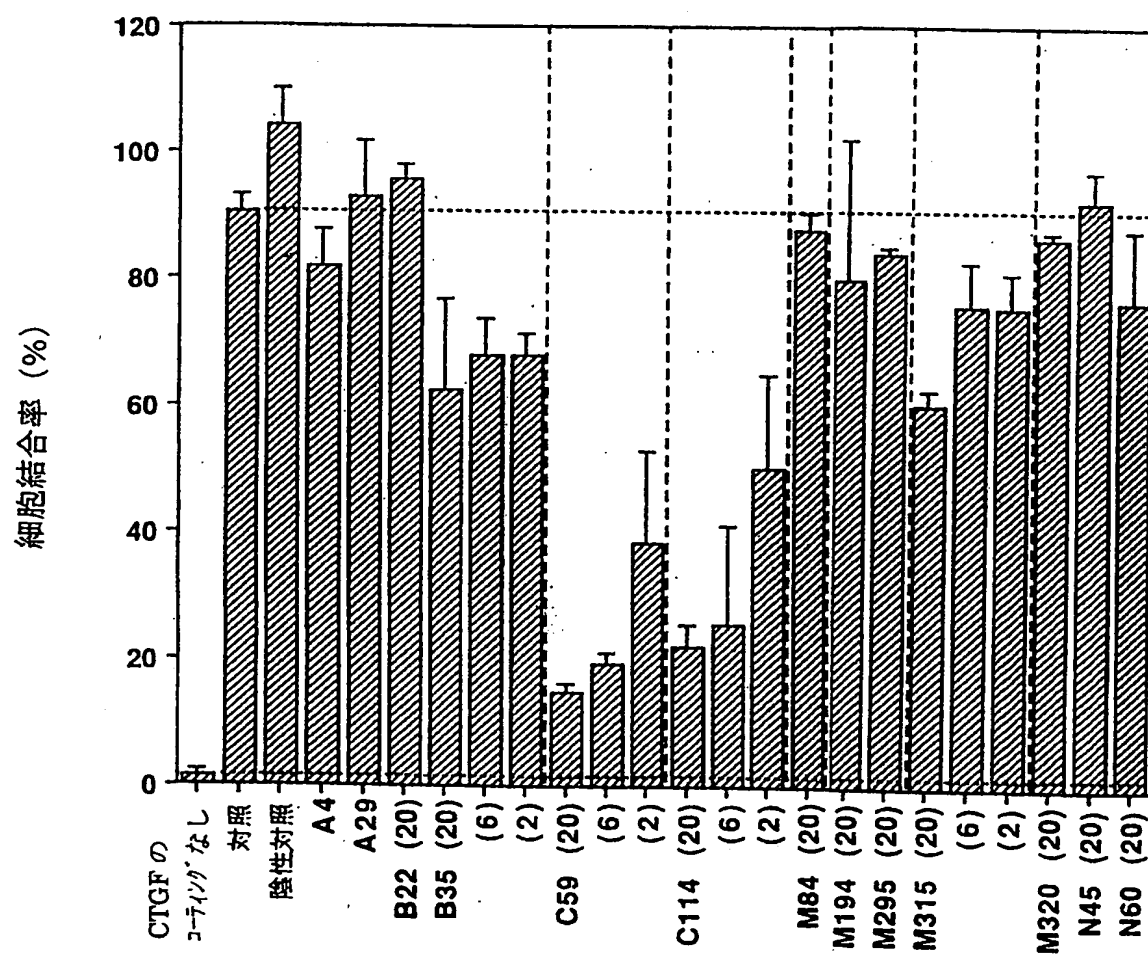
図 1 1



THIS PAGE BLANK (uspro)

12/25

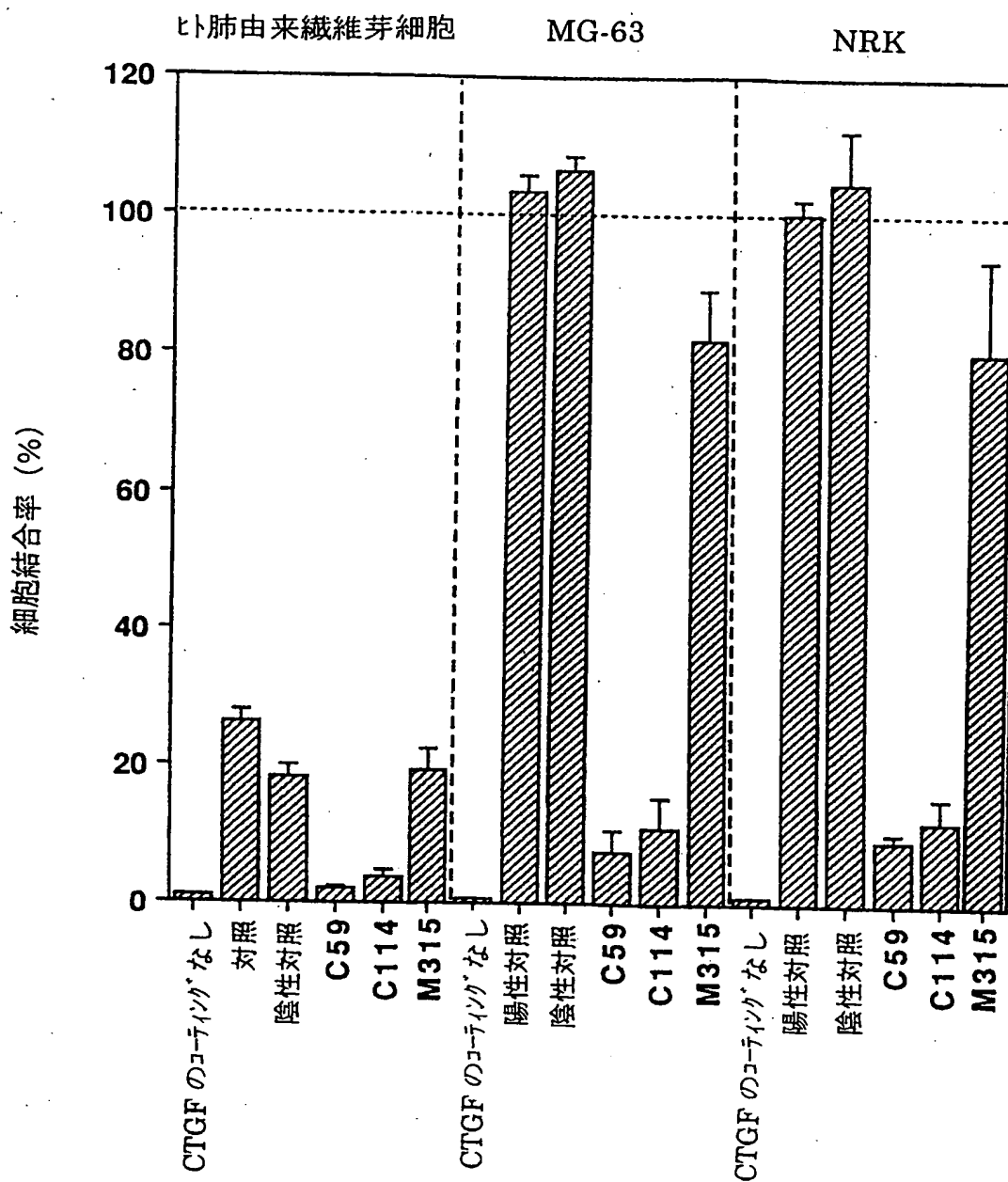
図 12



THIS PAGE BLANK (uspro)

13/25

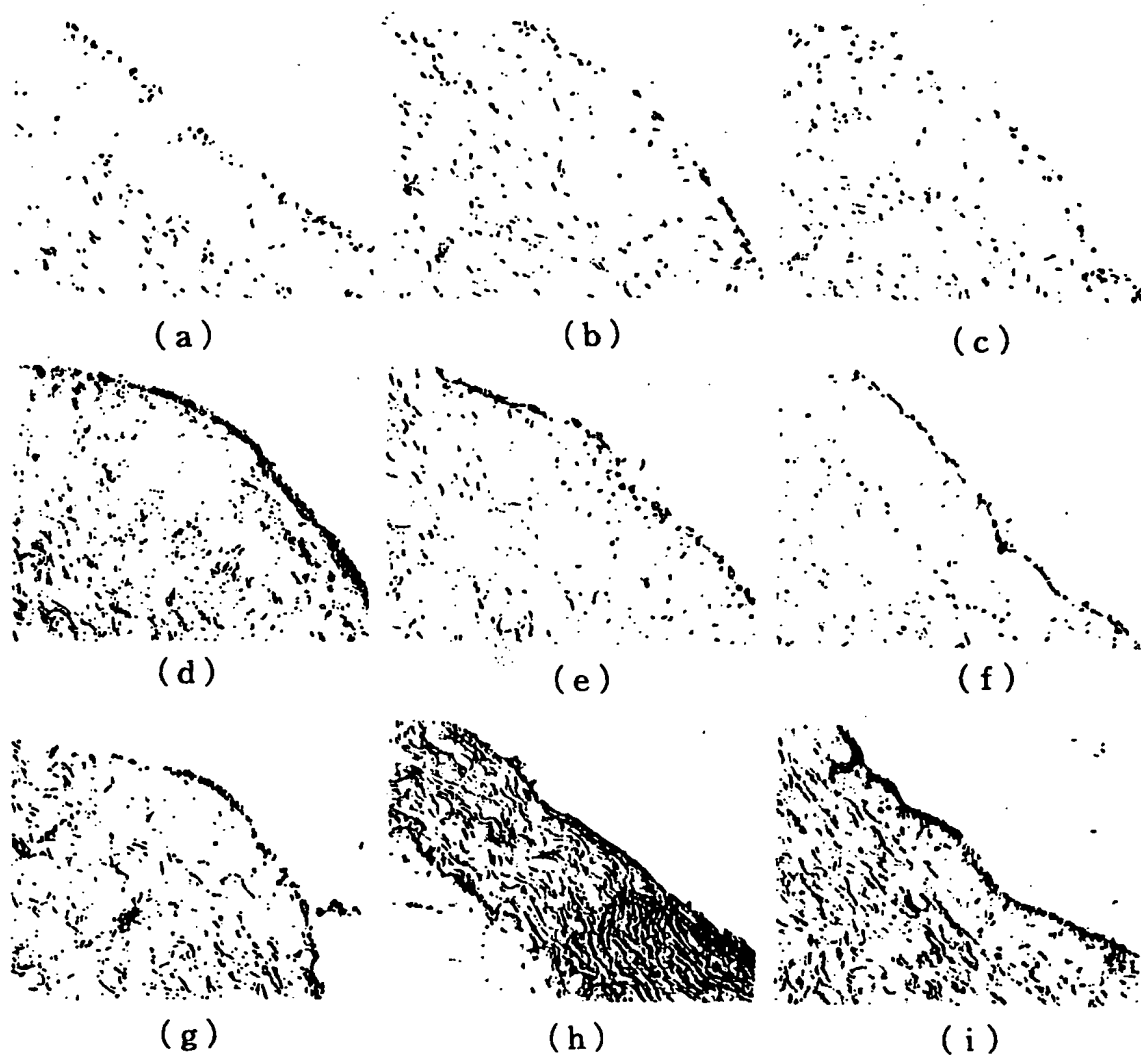
図 13



THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/25

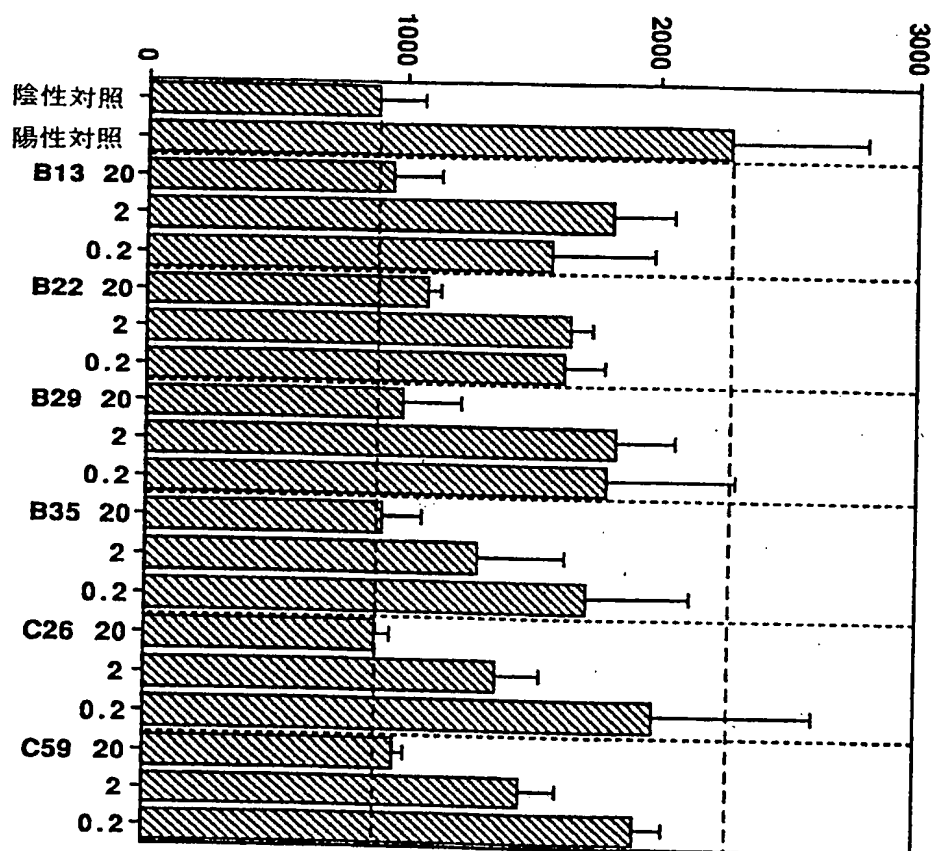
図 14



THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/25

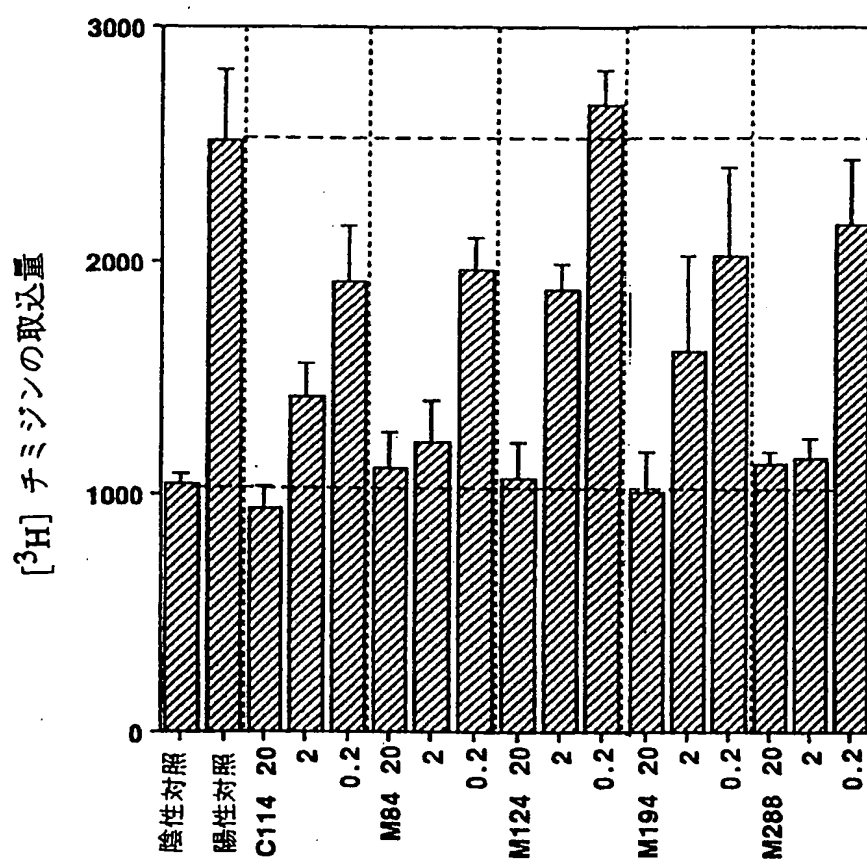
図15

[³H] チミジンの取込量

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16 / 25

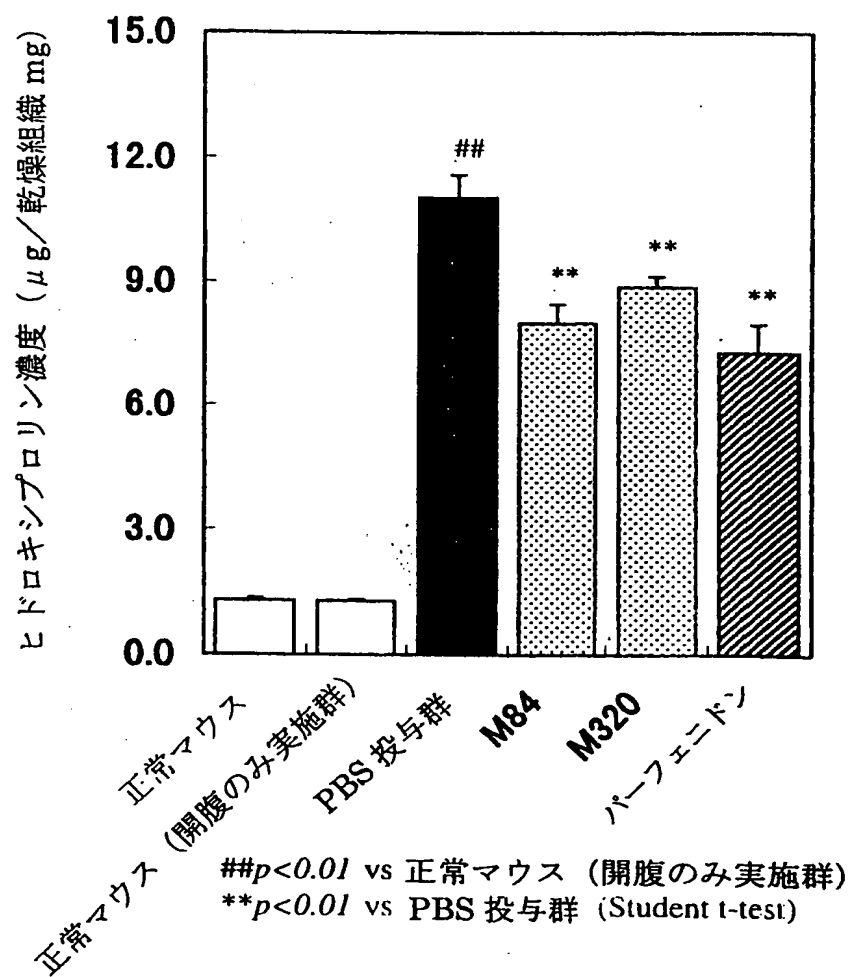
図 16



THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/25

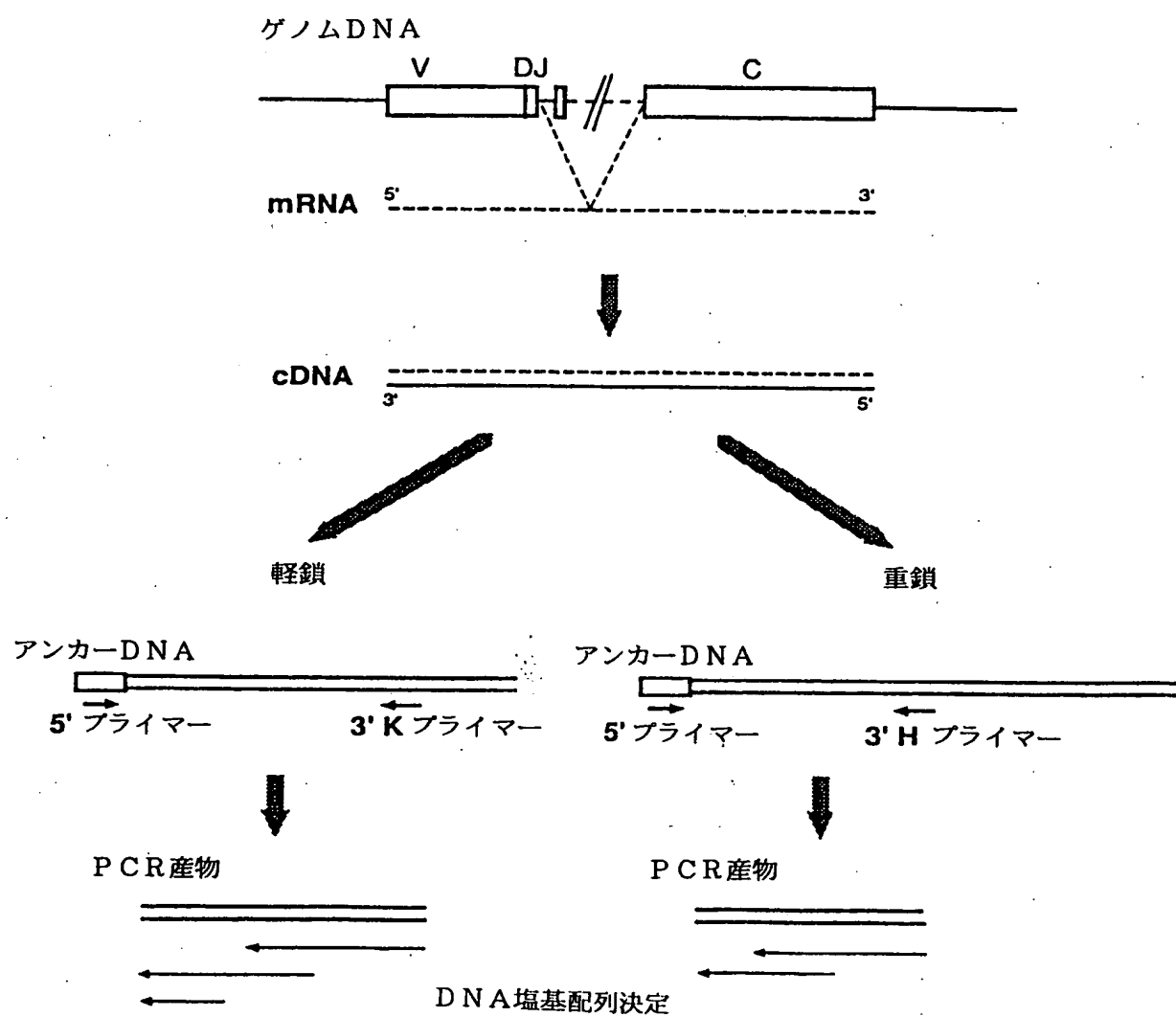
図 17



THIS PAGE BLANK (USPTO)

18/25

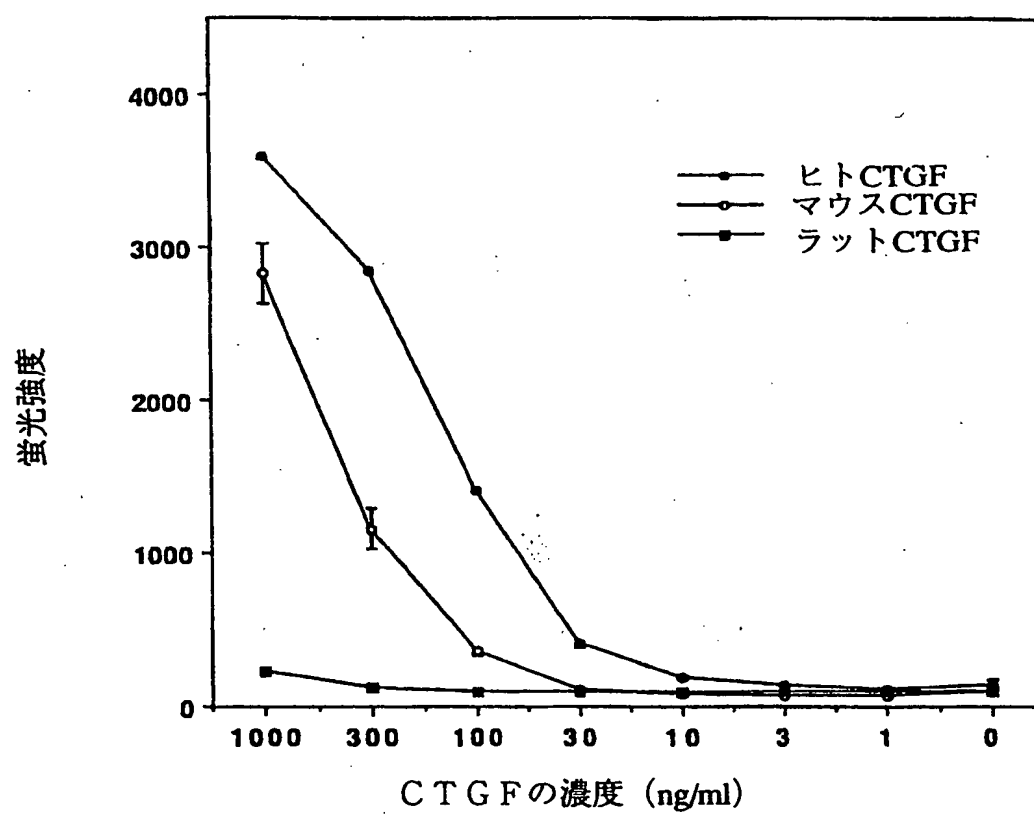
図18



THIS PAGE BLANK (USPTO)

19/25

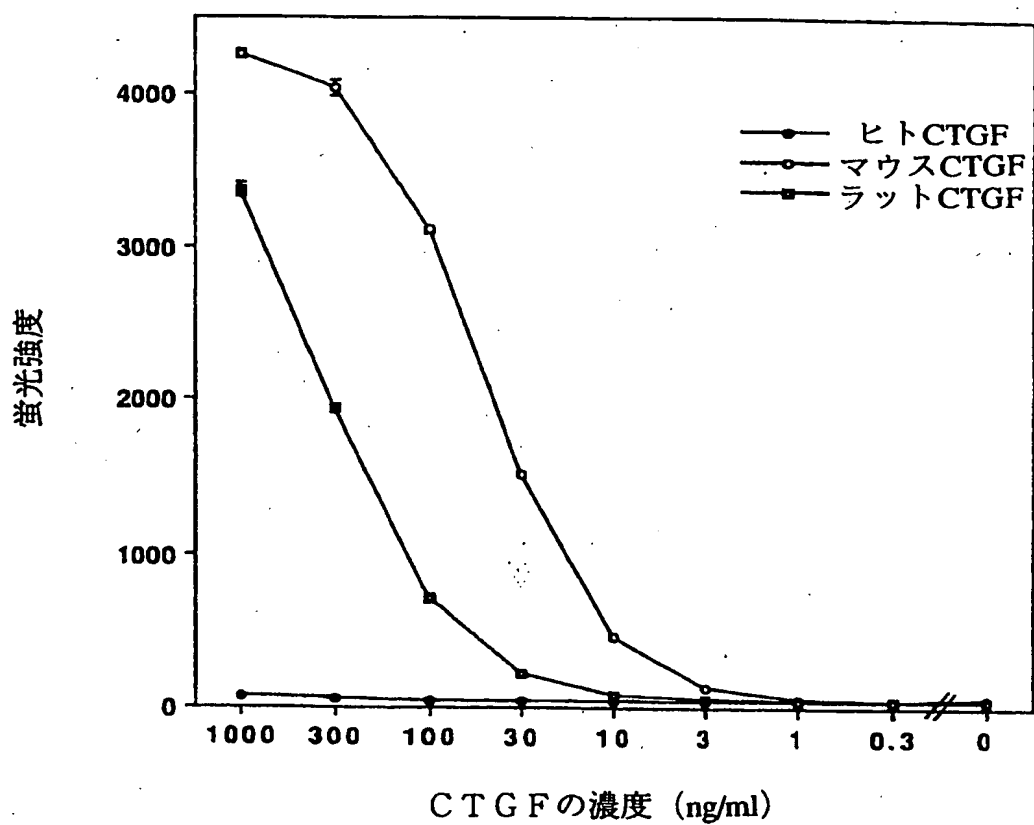
図 19



THIS PAGE BLANK DISPO

20/25

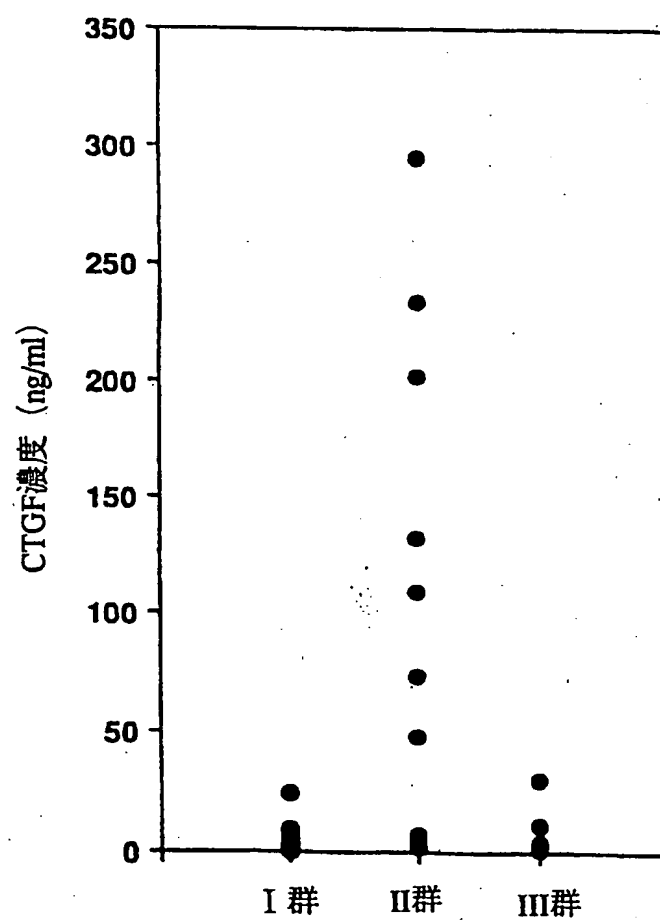
図 20



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 1 / 2 5

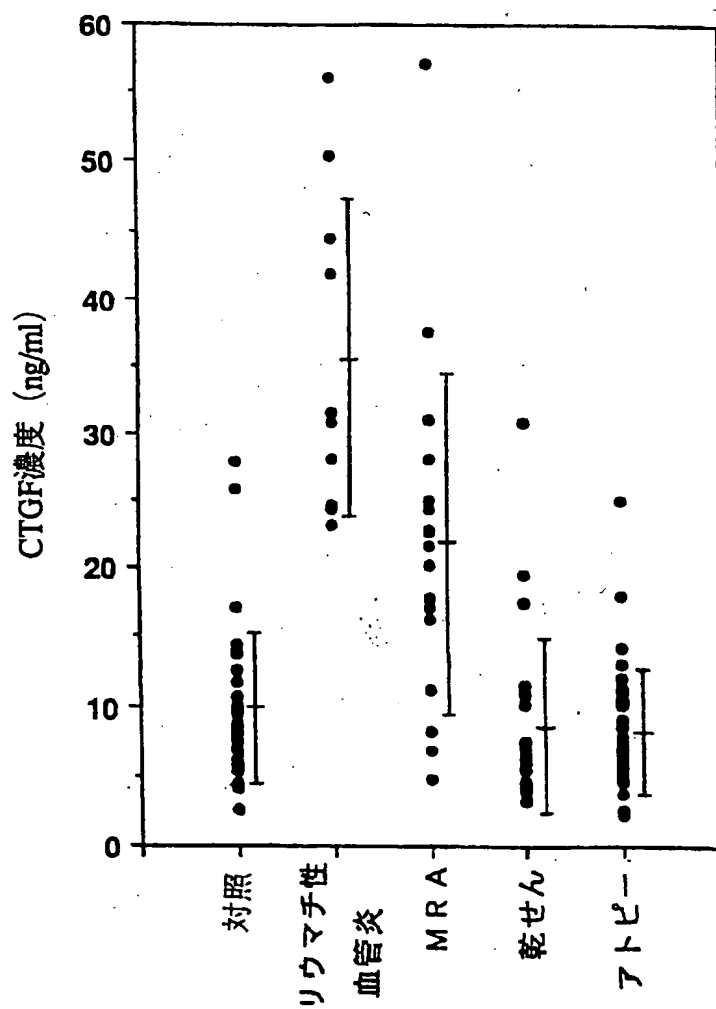
图 2 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

22/25

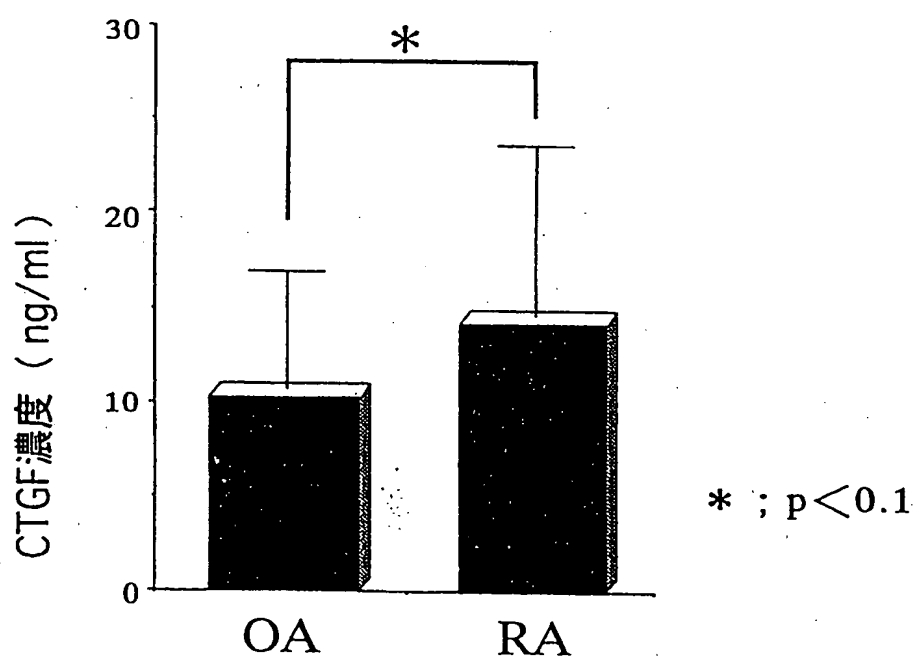
図 22



THIS PAGE BLANK (USPTO)

23/25

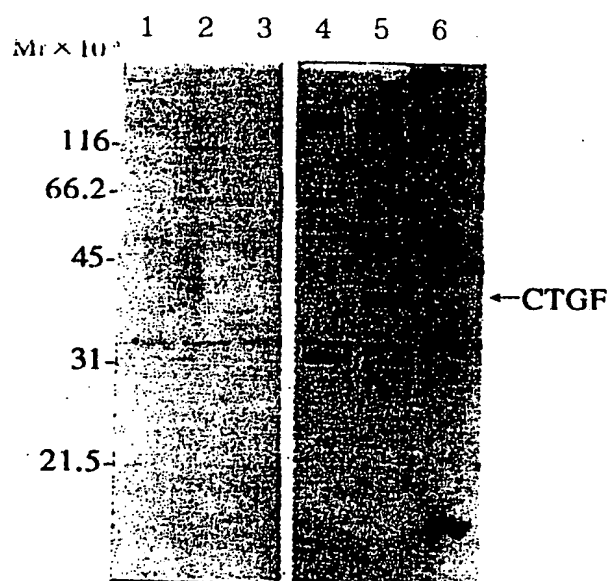
図 23



THIS PAGE BLANK (USPTO)

24/25

図 24

ブレイミューン - α CTGF -

SDS-PAGE

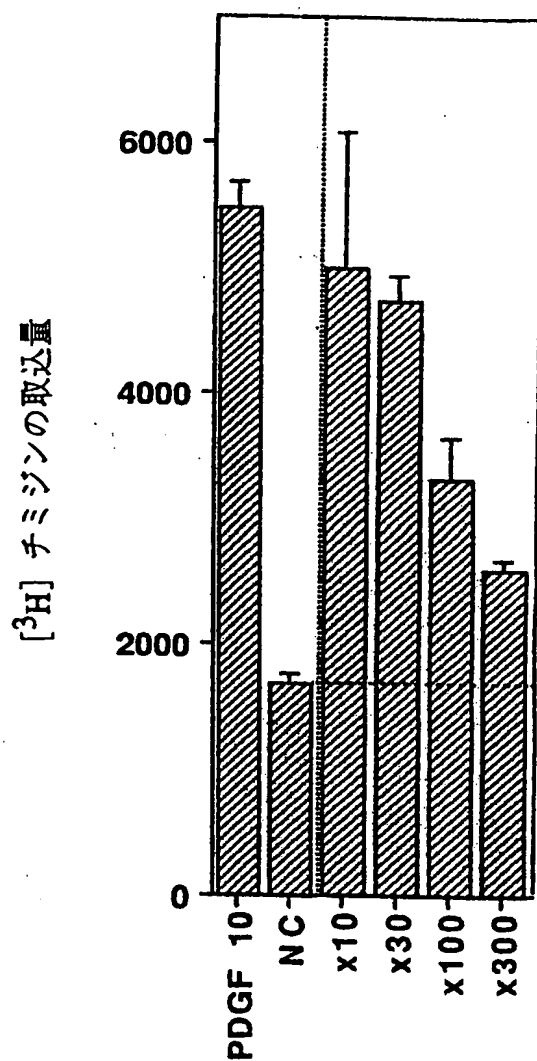
15/25% 濃度勾配ゲル

2-メルカプトエタノール (+)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25 / 25

図 25



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08, C12N15/06, C12N15/09,
A61K39/395, A61K45/00, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08, C12N15/06, C12N15/09,
A61K39/395, A61K45/00, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	Douglass M. Bradham et al., "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10", The Journal of Cell Biology (1991) Vol. 114 No. 6, p.1285-1294	60-62/8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65/ 1-7, 10, 19-26, 36-41, 59, 66-82
X/Y/A	Rolf-Peter Ryseck et al., "Structure, mapping and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cystein-rich protein", Cell Growth & Differentiation (1991) Vol. 2, No. 5 p.225-233	60-62/8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65/ 1-7, 10, 19-26, 36-41, 59, 66-82
Y	Michael J. Mendez et al., "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice", Nature Genetics (1997) Vol. 15, No. 2 p.146-456	8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
8 March, 1999 (08. 03. 99)

Date of mailing of the international search report
23 March, 1999 (23. 03. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05697

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Maria L. Kireeva et al., "Cyr61 and fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development", Experimental Cell Research (1997) Vol. 233, No. 1 p.63-77	8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65
Y	Devashish Kothapalli et al., "Transforming growth factor β induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway", Cell Growth & Differentiation (1997) Vol. 8, No. 1 p.61-68	8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C 07 K 16/18, C 12 N 5/20, C 12 P 21/08, C 12 N 15/06,
C 12 N 15/09, A 61 K 39/395, A 61 K 45/00, A 01 K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C 07 K 16/18, C 12 N 5/20, C 12 P 21/08, C 12 N 15/06,
C 12 N 15/09, A 61 K 39/395, A 61 K 45/00, A 01 K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/Gene Seq, Genbank/EMBL/DDBJ/Gene Seq,
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	Douglass M. Bradham et al. "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10", The Journal of Cell Biology (1991) Vol. 114, No. 6 p. 1285-1294	60-62/8-9, 11- 18, 27-35, 42- 58, 63-65/1-7, 10, 19-26, 36- 41, 59, 66-82
X/Y/A	Rolf-Peter Ryseck et al. "Structure, mapping and expression of <i>fisp-12</i> , a growth factor -inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein", Cell Growth & Differentiation (1991) Vol. 2, No. 5 p. 225-233	60-62/8-9, 11- 18, 27-35, 42- 58, 63-65/1-7, 10, 19-26, 36- 41, 59, 66-82

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 03. 99

国際調査報告の発送日

23.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Michael J. Mendez et al. "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice", Nature Genetics (1997) Vol. 15, No. 2 p. 146-456	8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65
Y	Maria L. Kireeva et al. "Cyr61 and fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development", Experimental Cell Research (1997) Vol. 233, No. 1 p. 63-77	8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65
Y	Devashish Kothapalli et al. "Transforming growth factor β induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway", Cell Growth & Differentiation (1997) Vol. 8, No. 1 p. 61-68	8-9, 11-18, 27-35, 42-58, 63-65